

**DER GLYKOGENABBAU
IM MENSCHLICHEN SKELETMUSKEL
UNTER DAUERLEISTUNGSBEDINGUNGEN
MIT UND OHNE ORALE GLUCOSEGABE
ERPROBUNG EINER NEUEN
BIOPSIE- UND BESTIMMUNGSTECHNIK**

Georg Erich Hoffmann

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0056

Aus dem Institut für Arbeitsphysiologie der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr.med. Wolf Müller-Limmroth

DER GLYKOGENABBAU IM MENSCHLICHEN SKELETMUSKEL UNTER DAUERLEISTUNGSBEDINGUNGEN MIT UND OHNE ORALE GLUCOSEGABE

- ERPROBUNG EINER NEUEN BIOPSIE- UND BESTIMMUNGSTECHNIK -

Von der

Fakultät für Medizin
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigte Dissertation

Vorgelegt von Georg Erich H o f f m a n n
geboren in Dentelein Kr. Feuchtwangen

1. Berichterstatter:
Prof.Dr.med. Wolf M ü l l e r - L i m m r o t h
2. Berichterstatter:
Prof.Dr.med. H. S c h w i e g k

Tag der Einreichung der Arbeit: 15.11.1973

Tag der Annahme der Arbeit : 21.12.1973

Tag der Promotion : 23.4.1974



THE UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY
 ANN ARBOR, MICHIGAN 48106-1000
 A LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

UNIVERSITY MICROFILMS
 SERIALS ACQUISITION
 300 N. ZEEB RD.
 ANN ARBOR, MI 48106-1500

1. Abstract

1.1	Abstract	1
1.2	Abstract	2
1.3	Abstract	3
1.4	Abstract	4
1.5	Abstract	5
1.6	Abstract	6
1.7	Abstract	7
1.8	Abstract	8
1.9	Abstract	9
1.10	Abstract	10
1.11	Abstract	11
1.12	Abstract	12
1.13	Abstract	13
1.14	Abstract	14
1.15	Abstract	15
1.16	Abstract	16
1.17	Abstract	17
1.18	Abstract	18
1.19	Abstract	19
1.20	Abstract	20
1.21	Abstract	21
1.22	Abstract	22
1.23	Abstract	23
1.24	Abstract	24
1.25	Abstract	25
1.26	Abstract	26
1.27	Abstract	27
1.28	Abstract	28
1.29	Abstract	29
1.30	Abstract	30
1.31	Abstract	31
1.32	Abstract	32
1.33	Abstract	33
1.34	Abstract	34
1.35	Abstract	35
1.36	Abstract	36
1.37	Abstract	37
1.38	Abstract	38
1.39	Abstract	39
1.40	Abstract	40
1.41	Abstract	41
1.42	Abstract	42
1.43	Abstract	43
1.44	Abstract	44
1.45	Abstract	45
1.46	Abstract	46
1.47	Abstract	47
1.48	Abstract	48
1.49	Abstract	49
1.50	Abstract	50
1.51	Abstract	51
1.52	Abstract	52
1.53	Abstract	53
1.54	Abstract	54
1.55	Abstract	55
1.56	Abstract	56
1.57	Abstract	57
1.58	Abstract	58
1.59	Abstract	59
1.60	Abstract	60
1.61	Abstract	61
1.62	Abstract	62
1.63	Abstract	63
1.64	Abstract	64
1.65	Abstract	65
1.66	Abstract	66
1.67	Abstract	67
1.68	Abstract	68
1.69	Abstract	69
1.70	Abstract	70
1.71	Abstract	71
1.72	Abstract	72
1.73	Abstract	73
1.74	Abstract	74
1.75	Abstract	75
1.76	Abstract	76
1.77	Abstract	77
1.78	Abstract	78
1.79	Abstract	79
1.80	Abstract	80
1.81	Abstract	81
1.82	Abstract	82
1.83	Abstract	83
1.84	Abstract	84
1.85	Abstract	85
1.86	Abstract	86
1.87	Abstract	87
1.88	Abstract	88
1.89	Abstract	89
1.90	Abstract	90
1.91	Abstract	91
1.92	Abstract	92
1.93	Abstract	93
1.94	Abstract	94
1.95	Abstract	95
1.96	Abstract	96
1.97	Abstract	97
1.98	Abstract	98
1.99	Abstract	99
1.100	Abstract	100

Meinen Eltern

DER GLYKOGENABBAU IM MENSCHLICHEN SKELETMUSKEL UNTER DAUER-
LEISTUNGSBEDINGUNGEN MIT UND OHNE ORALE GLUCOSEGABE
- ERPROBUNG EINER NEUEN BIOPSIE- UND BESTIMMUNGSTECHNIK -

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	6
1. <u>Glykogen-Stoffwechsel</u>	6
1.1 Glykogen	6
1.2 Glykogenolyse	7 - 8
1.3 Glykogen-Synthese	9
2. <u>Glucose-Stoffwechsel</u>	10
2.1 Glucose	10
2.2 Glucosephosphorylierung	10/11
2.3 Glykolyse	11
3. <u>Kohlenhydrat-Stoffwechsel bei muskulärer Arbeit</u>	12
3.1 Energievorrat	12
3.2 Aktivierungsperiode	12
3.3 Muskelglykogen-Utilisation	13
3.4 Blutglucose-Utilisation	13/14
3.5 Anteil von Glykogen und Glucose an der Kohlenhydrat-Gesamtverbrennung	14

	<u>Seite</u>
B. <u>Hauptteil</u>	14
4. <u>Fragestellung</u>	14/15
B. I. <u>Methodischer Teil</u>	15
5. <u>Entwicklung und Erprobung einer neuen Biopsienadel</u>	15
5.1 Erprobung bekannter Biopsienadeln	15
5.11 Biopsienadel nach BERGSTRÖM	16
5.12 Leberbiopsienadel nach MENGHINI	16/17
5.2 Beschreibung der neuentwickelten Muskelsaugbiopsienadel	17/18
5.3 Biopsietechnik	18
5.4 Ergebnisse	19/20
6. <u>Glykogen-Bestimmung</u> <u>- Ausarbeitung einer Mikromethode</u>	20
6.1 Grundlagen und Übersicht über die gebräuchlichen Verfahren	20/21
6.2 Glykogenbestimmung in Nadelbiopsieproben	21
6.3 Verbesserung der Bestimmungsmethodik	22
6.31 Einfrieren der Muskelprobe	22
6.32 Gefriertrocknung	23
6.33 Verwendung des Mikrolitersystems "Eppendorf"	23
6.34 Verkürzung der Analysenzeit	24
6.4 Beschreibung der modifizierten Methode	24
6.41 Geräte	24
6.42 Chemikalien	25
6.43 Herzustellende Lösungen	25
6.44 Vorbereiten der Muskelprobe und Gefriertrocknung	26

	<u>Seite</u>
6.45 Wägung	26
6.46 Gewebsaufschluß und Glykogenextraktion	26
6.47 Glykogenhydrolyse	27
6.48 Glucose-Bestimmung	27
6.49 Berechnung des Glykogengehalts	27
6.410 Anmerkungen	27/28
6.5 Ergebnisse	28
6.51 Eichkurven	28-31
6.52 Muskelglykogen-Bestimmung	31/32
6.53 Verwendbarkeit der Methode im Routine- betrieb	32
 B. <u>II. Experimenteller Teil</u>	 33
 7. <u>Versuchsaufbau</u>	 33
7.1 Material	33
7.2 Methoden	34
7.21 Fahrrradergometer	34
7.22 Pulsfrequenzmessung	34
7.23 Messung der Sauerstoffaufnahme	34
7.24 Glykogen-Bestimmung	35
7.25 Statistische Auswertung	35
7.3 Vorversuch	35/36
7.4 Hauptversuche	36
7.41 Arbeitsversuch	36/37
7.42 Arbeitsversuch mit oraler Glucosegabe	37/38
 8. <u>Ergebnisse</u>	 39
8.1 Sauerstoffaufnahme und Ergometerleistung	39
8.2 Pulsverhalten	39
8.3 Glucosurie	40

Seite

8.4	Glykogenverhalten im Musculus quadriceps femoris	40
8.41	Veränderung des Glykogen-Gehalts bei Arbeit	40-43
8.42	Muskelglykogen-Gehalt bei gleichzeitiger Glucosegabe	43-45
8.43	Glykogen-Vorrat und Trainingszustand	45-47
8.44	Beziehung des Glykogens zu anderen Stoffwechselfparametern	47
C.	<u>Diskussion</u>	48
9.	<u>Muskelbiopsie</u>	48
9.1	Biopsienadel	48/49
9.2	Biopsietechnik	49/50
10.	<u>Glykogenbestimmung</u>	50-52
11.	<u>Arbeitsversuche</u>	52
11.1	Arbeitsschwere	52/53
11.2	Ruheglykogenspiegel	53/54
11.3	Glykogenabbau bei mittelschwerer Arbeit	54-57
11.4	Einfluß einer oralen Glucosegabe auf den Glykogenabbau	57/58
D.	<u>Zusammenfassung</u>	59/60
E.	<u>Literaturverzeichnis</u>	61-68
	<u>Lebenslauf</u>	69
	<u>Danksagung</u>	70

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

ATP	= Adenosintriphosphat
AV	= Arbeitsversuch
AVG	= Arbeitsversuch mit oraler Glucosegabe
CP	= Creatinphosphat
F-1,6-P ₂	= Fructose-1, 6-Diphosphat
G-1-P	= Glucose-1-Phosphat
P _a	= anorganisches Phosphat
PP	= Pyrophosphat
Vp	= Versuchsperson

A. EINLEITUNG

Glykogen, das 1857 von A. SANSON (97) und C. BERNARD (12) entdeckt wurde, ist als Speichersubstanz des tierischen und menschlichen Körpers seit über 100 Jahren Gegenstand der biochemischen und physiologischen Forschung. In den letzten Jahren wandte sich das Interesse der Stoffwechselchemie sowie der Arbeits- und Sportphysiologie besonders dem Muskelglykogen des Menschen zu. Diese neue Phase der Glykogenforschung wurde im wesentlichen durch eine geeignete Biopsietechnik von BERGSTRÖM (8) und die grundlegenden Arbeiten von HULTMAN (46) eingeleitet. Von größtem Interesse sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Regulationsvorgänge, die den Glykogenstoffwechsel beeinflussen.

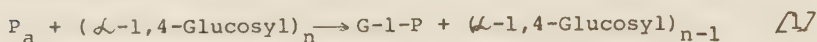
1. Glykogen-Stoffwechsel

1.1 Glykogen

Glykogen findet sich als makromolekulare Speicherform der Glucose in zahlreichen tierischen und bestimmten pflanzlichen Geweben sowie in Mikroorganismen (100) und ist ein hochgradig verzweigtes Homopolysaccharid aus D-Glucosyl-Einheiten in α -1,4- und α -1,6-Verknüpfung. Es gehört somit zur gleichen Gruppe von Polysacchariden wie die pflanzliche Stärke und unterscheidet sich von deren Amylopektinkomponente nur durch den relativen Grad der Verzweigung: während im Amylopektin der Anteil der 1,6-Bindungen zwischen 4 und 5 % variiert, liegt er im Glykogen bei 8 - 10 % (68). Glykogen ist in seinem Aufbau, nicht aber in seinem Molekulargewicht streng definiert. Dieses beträgt z.B. bei Leberglykogen ca. 3×10^8 (17), bei Muskelglykogen ca. 10^7 (79). Der Glykogengehalt der verschiedenen tierischen Zellen wechselt stark je nach Spezies, Organ, Aktivitäts- und Ernährungszustand. Elektronenmikroskopisch ist Glykogen im Sarkoplasma nachweisbar (46), wo sich auch die Enzyme des Glykogenstoffwechsels befinden (34).

1.2 Glykogenolyse

Am Abbau des verzweigten Makromoleküls sind zwei Enzyme beteiligt. Die Glykogenphosphorylase (α -1,4-Glucan: Orthophosphat-Glucosyltransferase) katalysiert die in vitro reversible (59) phosphorolytische Abspaltung endständiger Glucosyleinheiten in 1,4-Verknüpfung nach der Gleichung:



Amyloglucosidase (α -1,6-Glucan-Hydrolase) löst die 1,6-Verknüpfung an den Verzweigungspunkten hydrolytisch:



Das in der Phosphorylase-Reaktion gebildete G-1-P wird durch die Phosphoglucomutase-Reaktion (PGM) zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt.

Bis etwa 1930 hatte man eine hydrolytische Spaltung des Glykogenmoleküls für den ersten Schritt der Glykogenolyse angesehen, ähnlich der amylolytischen Hydrolyse bei der Verdauung. Erst die Arbeiten von CORI, SCHMIDT und LARNER führten zum Verständnis der phosphorolytischen Glucosylabspaltung durch Phosphorylase (20) und der hydrolytischen Lösung der 1,6-Verknüpfung durch Amyloglucosidase (21).

Die Phosphorylase-Reaktion ist in neuerer Zeit eingehend untersucht worden. Die wichtigsten Ergebnisse sind im folgenden zusammengestellt. Das Enzymmolekül besetzt die substratspezifischen Bindungsstellen für Glykogen und Phosphat in zufälliger Reihenfolge, d.h. der Enzymkomplex mit einem der beiden Substrate begünstigt die Bindung des anderen Substrats energetisch nicht. Dieser Reaktionstyp wird als rapid equilibrium, random, bi-bi bezeichnet (33). Das Phosphorylasemolekül existiert in einer phosphorylierten a- und einer dephosphorylierten b-Form. Die Affinität der b-Form zu ihren Substraten Glykogen und anorganisches Phosphat ist bei niedriger intrazellulärer Konzentration an 5'-AMP (Adenosinmonophosphat) geringer als die der

a-Form (39). Für die Phosphorylierung wird ATP benötigt (70). Beide Formen a und b kommen in dimerer und tetramerer Quartärstruktur vor. Die dephosphorylierte b-Form zeigt nur geringe Neigung zur Tetramerbildung, während für die a-Form eine inaktive tetramere Struktur existiert, die unter der Einwirkung von Glykogen und verwandten Substraten in die aktive dimere Form übergeht (72). Nach dem Modell von MONOD (74) existiert Phosphorylase in einem aktiveren R-Zustand (R = relaxed) und einem weniger aktiven T-Zustand (T = tight). Der Übergang zwischen beiden Formen entspricht einer Konformationsänderung (41), wie sie zuerst für Hämoglobin beschreiben wurde. Positive Effektoren, die das Gleichgewicht zugunsten der R-Form verschieben, sind die Liganden 5'-AMP, G-1-P, anorganisches Phosphat und Glykogen (41), der Anteil der T-Form erhöht sich vor allem durch die Anwesenheit von G-6-P (117).

Die Umwandlung der Phosphorylase b in Phosphorylase a wird durch eine Enzymkaskade bewirkt, ähnlich dem System der Blutgerinnungsfaktoren. Die aufeinanderfolgenden Glieder dieser Aktivierungskette sind Phosphorylase-b-Kinase (65) und Phosphorylase-b-Kinase-Kinase (106). Über das zyklische 3', 5'-AMP, das die Phosphorylase-b-Kinase-Kinase aktiviert, ist der Anschluß an das adrenalinabhängige Adenylcyclasesystem hergestellt, das in zahlreichen Organen Steuerungsfunktionen übernimmt (101).

Unter den in-vivo-Aktivatoren der Glykogenolyse haben vor allem Adrenalin (22), Glucagon (23) und Calciumionen (73) Bedeutung. Ca^{++} wird bei der Muskelkontraktion aus intramuskulären Vesikeln freigesetzt und benötigt für seine Wirkung zusätzlich einen spezifischen Proteinfaktor (73).

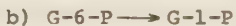
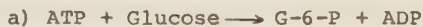
Entsprechend der Aktivierung durch Kinasen wird eine Inaktivierung durch Phosphatasen beschrieben (44), die allerdings in vielen Punkten noch hypothetisch ist.

1.3 Glykogen-Synthese

Weit weniger intensiv als der Glykogenabbau ist der Aufbau studiert worden. Nach der Entdeckung der Phosphorylase wurde allgemein angenommen, die Glykogensynthese sei die Umkehrung der Phosphorylase-Reaktion. Erst 1957 beschrieben LELOIR und CARDINI (67) die Glykogensynthetase (UDP-Glucose- α -1,4-Glucan: α -1,4-Glucosyltransferase), die die Anknüpfung von Glucosyleinheiten aus UDPG (Uridyldiphosphat-Glucose) in 1,4-Bindung an einen Glykogenakzeptor unter Freisetzung von UDP katalysiert:



Die Verzweigungspunkte in 1,6 Verknüpfung werden vom "branching enzyme" (Amylo-1,4-1,6-Transglucosidase) gebildet (66). Die Bereitstellung von UDPG aus Glucose erfolgt über die Hexokinase- (a), Phosphoglucomutase- (b) und UDPG-Pyrophosphorylase- (c) Reaktion nach dem Schema:



[4a-c/]



Das Glykogen synthetisierende System scheint ähnlich komplizierten Reaktionsmechanismen unterworfen zu sein wie das glykogenolytische. Es ist zu erkennen, daß verschiedene Effektoren (Hormone, Metabolite, Ionen) auf die beiden Systeme reziproke Wirkungen haben und dadurch eine ökonomische Steuerung des Glykogenauf- und -abbaus entsprechend den jeweiligen physiologischen Erfordernissen gewährleisten: G-6-P, das auf die Phosphorylase hemmend wirkt, aktiviert die Synthetase. Man unterscheidet zwischen einer G-6-abhängigen D-Form (D = dependent) und einer G-6-P-unabhängigen I-Form (I = independent) (103). Die D-Form wird unter Insulineinwirkung zur I-Form umgewandelt, so daß bei erhöhtem Glucoseangebot auch ohne Anhäufung von G-6-P Glykogen synthetisiert werden kann.

Adrenalin (28) und Ca^{++} in Verbindung mit einem spezifischen Proteinfaktor (6) verringern das Verhältnis I/D. Auch das Glykogen der Zelle kontrolliert über einen noch ungeklärten Mechanismus der D-I-Umwandlung seine eigene Synthese (28). I- und D-Synthetase unterscheiden sich wie Phosphorylase a und b durch den Grad der Phosphorylierung. Eine spezifische Kinase katalysiert die Umwandlung der I- in die D-Form, eine Phosphatase die Rückreaktion (32). Die Kinase wird durch zyklisches AMP und somit indirekt durch Adrenalin aktiviert (92). Es wird angenommen, daß auch in diesem Mechanismus eine eigene Enzymkaskade eingeschaltet ist (44).

2. Glucose-Stoffwechsel

2.1 Glucose

Bei der Energiebereitstellung durch den Abbau von Kohlenhydraten stehen dem Muskel neben dem endogenen Substrat Glykogen auf dem Blutweg herangeführte Saccharide zur Verfügung, unter denen der D-Glucose die größte physiologische Bedeutung zukommt. Sie wird entweder mit der Nahrung, meist in Form von Di- und Polysacchariden aufgenommen, im Darm durch Hydrolyse freigesetzt und resorbiert oder aus dem Glykogen der Leber unter der Wirkung von Phosphorylase, Phosphoglucomutase und Glucose-6-Phosphatase gebildet. Auch aus den Abbauprodukten des Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsels kann die Leber Glucose resynthetisieren.

2.2 Glucosephosphorylierung

In die Muskelzelle gelangt die im arteriellen Blut zugeführte Glucose über ein stereospezifisches Transportsystem (75), das durch Anoxie, Kontraktionsarbeit und Insulin aktivierbar ist. Die Einschleusung der freien Glucose in den Energie liefernden Stoffwechsel geschieht über die in vivo irreversible Hexokinase-(HK-) Reaktion:



/5/

Diese Reaktion ist für die Glucose-Utilisation limitierend, da die Transportgeschwindigkeit des voll aktivierten Glucosecarriers die maximale Umsatzrate der Hexokinase weit übersteigt (105). Aktivierung der Hexokinase im isolierten Froschmuskel durch Anoxie, Insulin und elektrische Reizung beobachteten KARPATKIN et al. (53), auch ein Anstieg der Aktivität in vivo bei Training wurde beschrieben (63, 64, 83). Bei erschöpfender Arbeit nimmt die HK-Aktivität im Muskel ab (5, 64) und steigt anschließend unter Ruhebedingungen wieder an (63). Der Mechanismus der HK-Aktivierung ist noch nicht voll geklärt. Eine mitochondrial gebundene, höher molekulare H-Form (H = heavy) und eine gelöste, niedriger molekulare L-Form (L = light) wurden beschrieben (54), die interconvertierbare Formen des Enzyms mit verschiedener Aktivität darstellen.

Mit der Bildung von G-6-P mündet der Glucosestoffwechsel in denselben "pool" wie die Glykogenolyse. Von hier ab werden beide Substrate auf demselben Weg unter Energiegewinn abgebaut.

2.3 Glykolyse

Die gemeinsame Endstrecke des Glykogen- und Glucoseabbaus beginnt mit der Glykolyse, die entweder mit der Bildung von Laktat abschließt oder über die Schlüsselenzyme Pyruvatdehydrogenase (PDH) und condensing enzyme in den gemeinsamen Abbauweg der Kohlenhydrate und Fette, den Citratzyklus einmündet. Die Glykolyse hat für die Erläuterung des bisher Gesagten nur insofern Bedeutung, als die Phosphofruktokinase als Schlüsselenzym der Kohlenhydratverbrennung die Konzentration von G-6-P kontrolliert und somit indirekt die Aktivität der Phosphorylase, Synthetase und Hexokinase steuert (103). Die einzelnen Schritte der Glykolyse haben für die spezielle Problematik der vorliegenden Arbeit nur untergeordnete Bedeutung und sollen deshalb nicht näher beschrieben werden.

3. Kohlenhydrat-Stoffwechsel bei muskulärer Arbeit

3.1 Energievorrat

Als Energiequellen stehen dem arbeitenden Muskel unter den Kohlenhydraten im wesentlichen Muskelglykogen, Leberglykogen, Blutglucose und mit der Nahrung aufgenommene Saccharide zur Verfügung. Der Muskelglykogen-Gehalt im Musculus vastus lateralis des Menschen beträgt 1,0 bis 2,2 g%, im Musculus deltoideus 0,5 bis 1,4 g% (47), der Leberglykogen-Gehalt 1,5 bis 6 g% (87). Der mittlere arterielle Glucose-Spiegel liegt bei $4,4 \times 10^{-6}$ Mol/ml Blut (58). Der gesamte Glykogen-Vorrat des menschlichen Körpers wird auf ca. 500 g, maximal 700 g geschätzt (38), der Vorrat an Blutglucose auf 4,3 g (59). Der gesamte Glucose-Pool des Menschen wird mit 24,8 g angegeben (89).

3.2 Aktivierungsperiode

Bei Arbeitsbeginn können Glykogenolyse und Glykolyse innerhalb weniger Sekunden aktiviert werden (40, 26), was auf eine kontraktionsbedingte Anhäufung von Ca^{++} , eine Adrenalinausschüttung und einen Anstau von Intermediärprodukten des Stoffwechsels zurückgeführt wird. Bereits 0,5 sec nach Einsetzen einer tetanischen Reizung des Muskels wird eine meßbare Phosphorylaseaktivierung gefunden (93). ATP und CP dienen solange als "Sofortquelle" energiereicher Substrate, bis aus dem Kohlenhydratstoffwechsel über die Substratketten- und Atmungskettenphosphorylierung genügend ATP für die Kontraktion zur Verfügung gestellt wird. Der Kreatinphosphat-Vorrat reicht für eine fast 20 sec dauernde starke Kontraktionsarbeit aus (59) und genügt also für einen 100-m-Lauf. KARLSSON und SALTIN (50) fanden beim Menschen einen raschen, von der Arbeitsintensität abhängigen Abfall von Kreatinphosphat, jedoch nur eine geringe Senkung des ATP-Spiegels, der unabhängig von der Arbeitsschwere nach 2 min einen steady-state-Wert erreicht hatte. Dies spricht dafür, daß nach dieser kurzen Zeit die Regeneration des

für die Muskelkontraktion notwendigen ATP aus anderen energiereichen Phosphatspeichern erfolgt. Durch Training wird der ATP-Vorrat erhöht (52).

3.3 Muskelglykogen-Utilisation

Während in Ruhe weniger als 5 % der Phosphorylase in der a-Form vorliegen, sind 3 sec nach Beginn einer tetanischen Reizung 100 % des Enzyms phosphoryliert (26). Eine Inkubation mit Adrenalin bewirkt erst nach 40 min eine Aktivierung von 5 auf 55 % (26). Somit dürfte der unter Arbeit beobachteten Adrenalin-Ausschüttung (102) für die Aktivierung des glykogenolytischen Systems nur eine geringe quantitative Bedeutung zukommen. Allerdings bewirkt Adrenalin ein rascheres Einsetzen der kontraktionsbedingten Aktivierung (27), was praktische Bedeutung für die Verbesserung der "Startbereitschaft" des Sportlers haben könnte.

Beim Menschen bewirkt Fahrradergometer-Arbeit, die im Verlauf einer Stunde zur Erschöpfung führt, nahezu völligen Abbau der Glykogen-Reserven in der arbeitenden Muskulatur (10), wobei in den ersten 15 min der stärkste Abfall beobachtet wird. Arbeit im Dauerleistungsbe- reich führt zu einer deutlichen, jedoch geringeren Senkung der Glykogen-Konzentration (30). BERGSTRÖM und HULTMAN (10) fanden eine gute Korrelation zwischen Glykogen-Abbau und relativer Arbeitsschwere. Ebenso besteht ein enger Zusammenhang zwischen Arbeitsdauer und Gesamtglykogen-Abbau (2). Kohlenhydratreiche Diät, durch die der Glykogenvorrat erhöht wird (9, 49), steigert die Ausdauerfähigkeit bei anstrengender Muskelarbeit (1).

3.4 Blutglucose-Utilisation

Homöostase des arteriellen Blutzucker-Spiegels setzt Gleichheit von peripherer Glucose-Verbrennung und Nachschub aus den Depots des Körpers voraus. Das bei mittelschwerer Arbeit beobachtete Absinken des Glucose-Spiegels (60, 88) ist also auf ein Mißverhältnis zwischen Verbrauch

und Nachfuhr anzusehen. Bei leichter Arbeit fällt der Glucose-Spiegel nur geringfügig (59). Bei kurzfristiger Arbeit in maximalen Bereichen wird ein Anstieg des Blutglucose-Spiegels beobachtet (42).

3.5 Anteil von Glucose und Glykogen an der Kohlenhydrat-Verbrennung

Entsprechend dem hohen Phosphorylase- und niedrigen Hexokinasegehalt zahlreicher tierischer Muskeln, besonders der weißen Fasern (84) ist eine stärkere Beteiligung des Glykogens an der Energiegewinnung und geringere Blutglucose-Utilisation zu erwarten. Bei geringer Reizfrequenz verwertet der Muskel Blutglucose (19), bei tetanischer Reizung stammen 90 % der verbrannten Glucose aus Glykogen (24). Untersuchungen darüber, ob von außen zugeführte Glucose muskeleigenes Glykogen ersetzen kann, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (2, 10, 30). EHRENSTEIN et al. (30) beobachteten eine negative Korrelation zwischen Glucose-Spiegel und Glykogen-Abbau.

B. HAUPTTEIL

4. Fragestellung

Direkte Untersuchungen über den Glykogen-Stoffwechsel des Menschen wurden erst in den letzten Jahren durchgeführt. Der weitaus größte Teil der bisher erschienenen Arbeiten stammt von der Forschergruppe um BERGSTRÖM, HULTMAN und SALTIN. Eine der wesentlichsten Schwierigkeiten bei der Durchführung derartiger Untersuchungen ist die Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus der menschlichen Skelettmuskulatur. Der größte Teil der Muskelproben der vorliegenden Versuchsserie wurde mit der BERGSTRÖM-Nadel entnommen. Um den bioptischen Eingriff einfacher und weniger schmerzhaft zu gestalten, wurde im Laufe der Untersuchungen eine neue Biopsienadel entwickelt und an fünf Versuchspersonen erprobt.

Durch Modifizierung der von HULTMAN (46) angegebenen chemischen Glykogen-Bestimmungsmethode konnte die Analysenzeit verkürzt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert werden. Beide Neuerungen werden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit dargestellt.

Die im zweiten Teil beschriebenen Versuche führen die Untersuchungen von EHRENSTEIN, EMANS und MÜLLER-LIMMROTH (30) unmittelbar fort. Es wurde der zeitliche Verlauf des Glykogenabbaus unter Dauerleistungsbedingungen verfolgt und der Effekt einer oralen Glucosegabe auf die Glykogenabbaurate untersucht. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- a) Findet bei relativ kurz dauernder Arbeit (2 h) an der Dauerleistungsgrenze ein meßbarer Glykogenabbau statt?
- b) Ist ebenso wie bei erschöpfender Arbeit die stärkste Abbaurate zu Arbeitsbeginn zu beobachten?
- c) Hat eine kontinuierliche, orale Glucosegabe einen "glykogensparenden" Effekt?

B. I. Methodischer Teil

5. Entwicklung und Erprobung einer neuen Biopsienadel

5.1 Erprobung bekannter Biopsienadeln

Die SILVERMANN-Nadel wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht verwendet. Die Zerstörung von Muskelgewebe dürfte ebenso groß wie bei der BERGSTRÖM-Nadel sein, da zwei mit Widerhaken versehene Metallblätter in intaktes Muskelgewebe vorgeschoben werden, um eine Probe abzureißen.

5.11 Biopsienadel nach BERGSTRÖM

BERGSTRÖM beschrieb 1962 eine einfache Nadel zur Entnahme von Muskelproben (8). Sie besteht aus zwei form-schlüssig ineinanderlaufenden Hohlzylindern. Der äußere ist mit einer Spritze verschlossen und trägt nahe diesem Ende eine seitliche Aussparung. Der innere ist am unteren Ende offen und als Schneide angeschliffen, am oberen Ende trägt er einen scheibenförmigen, in der Mitte durchbohrten Griff, so daß er in seiner vollen Länge durchgängig ist. Entnahmen werden nach der von BERGSTRÖM (8) und HULTMAN (47) angegebenen Biopsietechnik durchgeführt: Nach Lokalanästhesie wird die Nadel durch einen Hautschnitt eingeführt. Die Muskelfaszie wird stumpf durchstoßen und die Nadel noch 3 - 4 cm tief in das Muskelgewebe vorgeschoben. Mit der freien Hand tastet der Untersucher an der Oberschenkelaußenseite die gut palpierbare Nadelspitze, öffnet durch Hochziehen des Innenzylinders die seitliche Aussparung und preßt durch Fingerdruck Muskelgewebe in diese Öffnung. Durch Herabschieben des Innenzylinders wird die in der Nadel befindliche Gewebprobe abgeschnitten. Sie kann nach dem Herausziehen der Nadel mit einem Metallstab aus dem Innenzylinder herausgeschoben werden. Zur Wundversorgung ist eine Klammer oder Naht erforderlich.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden zahlreiche Entnahmen nach der beschriebenen Biopsietechnik vorgenommen. Die Versuchspersonen gaben trotz sorgfältiger Lokalanästhesie bis zur Faszie häufig Schmerzen an, vor allem beim Durchstoßen der Faszie, während des Fingerdrucks auf den Oberschenkel und beim Abschneiden der Gewebprobe. Behinderung durch die Wundklammern und längerwährende Gehbeschwerden, die vor allem bei Sportlern zu einer vorübergehenden Leistungsminderung führten, wurden häufig beobachtet. Einige Vpn klagten über hypästhetische Zonen distal des Hautschnitts. Ein Großteil dieser Auswirkungen kann auf den Durchmesser der Nadel von 3,5 - 5 mm und den dadurch bedingten relativ großen Hautschnitt durchgeführt werden. Da sich der Fingerdruck nicht geradlinig auf die Öffnung hin ausbreitet, dürfen die angegebenen Mindestmaße nicht unterschritten werden, damit noch genügend Gewebe in die Aussparung gelangt.

5.12 Leberpunktionsnadel nach MENGHINI

Wesentlich dünner als die BERGSTRÖM-Nadel ist die Kanüle der Leberbiopsie-Nadel nach MENGHINI (71), die wie eine Injektionspritze gebaut ist. Das durch Aspiration angesaugte Lebergewebe wird durch den Unterdruck festgehalten und beim Herausziehen der Nadel abgerissen. Eigene Versuche mit dieser Biopsienadel an tierischem Muskelgewebe und an der Leiche erbrachten keine befriedigenden Resultate, da der durch eine 5-ccm-Spritze erzeugte Unterdruck nach überschlägiger Berechnung nur

genügt, um eine Muskelprobe in die Kanüle zu saugen, nicht jedoch, um das relativ kompakte Gewebestück aus dem Verband zu reißen. Durch Vergrößerung des Spritzenvolumens ist, wie sich nach dem Boyle-Mariotte'schen Gesetz zeigen läßt, keine wesentliche Verbesserung der Saugkraft zu erzielen.

5.2 Beschreibung der neuentwickelten Muskelsaugbiopsienadel^{x)}

Die im folgenden beschriebene Anordnung (s. Abb. 1) stellt eine Kombination des Schneideprinzips nach BERGSTRÖM mit dem Saugprinzip nach MENINGHINE dar. In Analogie zur Dünndarmsaugbiopsienadel, die ähnlich arbeitet, wird der Name "Muskelsaugbiopsienadel" vorgeschlagen.

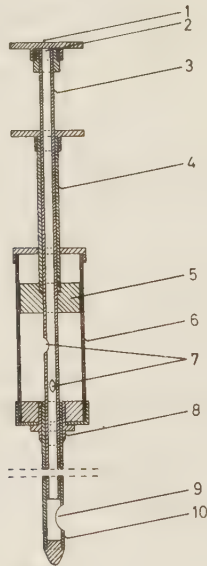


Abb. 1: Längsschnitt durch die Muskelsaugbiopsienadel.
1 = Rändelschraube, 2 = obere Öffnung des Schneidezylinders, 3 = Schneidezylinder, 4 = Pumpenstempel, 5 = Pumpenkolben, 6 = Spritzenteil, 7 = seitliche Bohrungen, 8 = Flansch, 9 = seitliche Aussparung der Einstichkanüle, 10 = Einstichkanüle.

^{x)} Die Muskelsaugbiopsienadel ist als Gebrauchsmuster

Die Nadel besteht aus einem Spritzenteil [6] mit 5 ccm Saugvolumen. Über einen Flansch [8] ist dieses mit einer Einstechkanüle [10] verbunden, die eine seitliche Aussparung [9] nahe der verschlossenen Kanülenspitze trägt. Durch Pumpenstempel [4], Pumpenkolben [5] und Einstechkanüle [10] läuft formschlüssig der Schneidezylinder [3], der in seiner ganzen Länge axial beweglich ist. Er trägt seitliche Bohrungen [7], durch die der bei Aspiration erzeugte Unterdruck am Orte der Aussparung wirksam wird. Die freie obere Öffnung [2] des Schneidezylinders [3] trägt eine Rändelschraube [1], die zur Entnahme der Muskelprobe abgenommen werden kann.

5.3 Biopsietechnik

Nach Lokalanästhesie von Haut, Unterhautfettgewebe und Faszie wird eine Stichinzision gesetzt. Vor Beginn des Biopsie-Vorgangs sind der Pumpenstempel und Schneidezylinder der sterilen Nadel vollständig herabgeschoben, so daß die seitliche Öffnung der Einstechkanüle verschlossen ist. Die Nadel wird in die Inzision eingeführt, durch die Faszie gestoßen und noch etwa 3 - 5 cm tief ins Muskelgewebe vorgeschoben. Nun wird der Schneidezylinder so weit zurückgezogen, daß die seitliche Öffnung der Einstechkanüle freigegeben wird (Sichtmarke am Schneidezylinder), der Pumpenstempel zur Aspiration mit Zeige- und Mittelfinger vollständig hochgezogen und anschließend der Schneidezylinder mit dem Daumen bis zum Anschlag heruntergeschoben. Die angesaugte Muskelprobe wird dadurch abgeschnitten. Eine Hand bleibt während des gesamten Biopsievorganges zum Halten der Nadel frei. Die Nadel wird aus der Inzision gezogen und die Muskelprobe nach Abschrauben der Rändelschraube aus dem Schneidezylinder herausgestoßen. Zur Versorgung der Wunde genügt ein Druckverband aus Tupfer und Heftpflaster.

5.4 Ergebnisse

Die beschriebene Biopsienadel wurde in der Werkstatt des Instituts für Arbeitsphysiologie der Technischen Universität München gebaut.^{x)} Aus materialtechnischen Gründen wurden folgende Abmessungen gewählt: Kanülenlänge 85 mm, Kanülenaußendurchmesser 2,4 mm, Wandstärke der Kanüle 0,2 mm, Außendurchmesser des Schneidezylinders 2,0 mm, Wandstärke 0,1 mm, Fläche der seitlichen Aussparung 10 mm².

Die Nadeln wurden an frischem Fleisch und am Menschen erprobt. An einem Stück Fleisch (Oberschenkelmuskulatur des Rindes) wurden 50 Probeentnahmen durchgeführt. Das mittlere Probenfeuchtgewicht betrug $6,71 \pm 2,67$ mg. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, waren die Gewichte normalverteilt.

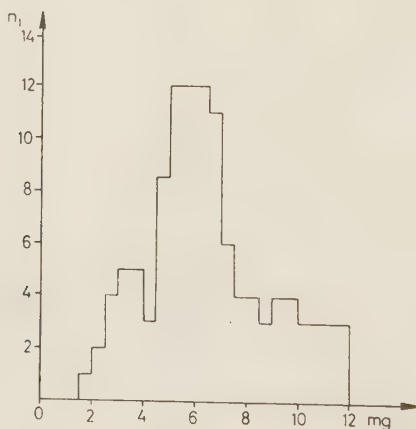


Abb. 2: Normalverteilung der Feuchtgewichte von 50 mit der Muskelsaugbiopsienadel gewonnenen Proben.

^{x)} Dem Werkstattleiter Herrn HABERL sei an dieser Stelle für die ausgezeichnete technische Realisation der Biopsienadel gedankt.

Die Biopsietechnik wurde an 5 Versuchspersonen erprobt. Das mittlere Gewicht der Proben lag mit 6,23 mg im angegebenen Bereich. Der Zeitbedarf für eine Biopsie vom Einführen der Nadel bis zum Herausziehen betrug ca. 5 sec, der eigentliche Biopsievorgang (Ansaugen und Abschneiden der Probe) benötigte weniger als 1 sec.

6. Glykogen-Bestimmung - Ausarbeitung einer Mikromethode

6.1 Grundlagen und Übersicht über die gebräuchlichen Verfahren

Die grundlegenden Arbeiten über die Messung des Glykogen-Gehalts in tierischen Geweben stammen von PFLÜGER (85). Das Prinzip der Methode von PFLÜGER wird auch heute noch angewendet:

- a) Gewebsaufschluß in heißer Kalilauge.
- b) Ausfällung des freigesetzten Glykogens in alkoholischer Lösung.
- c) Hydrolyse des präzipitierten Glykogens in heißer Schwefelsäure.
- d) Bestimmung der freigesetzten Glucose.

Modifikationen für alle vier Schritte wurden angegeben. Vor allem der Gewebsaufschluß und die Glykogen-Extraktion waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. BLOOM et al. (14) erzielten eine geringere Glykogen-Ausbeute, wenn sie Leber- und Muskelgewebe statt durch Verkochen in KOH durch Homogenisieren in Trichloressigsäure (TCA) zerstörten. ROE et al. (90) fanden nach TCA-Extraktion 57 % des Glykogens wieder, nach anschließender KOH-Extraktion die restlichen 43 %. Aus diesen und ähnlichen Befunden wurde auf die Existenz eines TCA-extrahierbaren "freien Lyoglykogens" und eines KOH-extrahierbaren "proteingebundenen Desmoglykogens" geschlossen. Erst 1961 erzielten ROE et al. (91) durch Homogenisation bei 45 000 UPM ebenso hohe Glykogen-

ausbeuten wie nach Gewebsaufschluß in heißer KOH. Eine Unterscheidung zwischen den genannten Glykogenfraktionen nach dem Gesichtspunkt der Extrahierbarkeit kann deshalb nicht mehr aufrechterhalten werden.

Um vollständige Glykogenpräzipitation zu erzielen, wurden verschiedene Modifikationen der Methode von PFLÜGER angegeben: Kühlung der alkoholischen Lösung im Eisbad (47), Zusatz von Elektrolyten wie Natriumsulfat (80) und Zinkhydroxid (16) oder Adsorption an Tierkohle (96) wurden vorgeschlagen. Das durch Fällung erhaltene Glykogen kann nicht nur als hydrolysierte Glucose enzymatisch (30) oder mit o-Toluidin (47) sondern auch direkt papierchromatographisch (98) oder mit Anthron (18) bestimmt werden.

Enzymatische Hydrolyse des Glykogens durch Amyloglucosidase (57) oder Phosphorolyse durch Glykogenphosphorylase (81) sollen geringfügig höhere Ausbeuten als die saure Hydrolyse in heißer Schwefelsäure liefern.

6.2 Glykogen-Bestimmung in Nadelbiopsieproben

Besonders die älteren der angegebenen Methoden erforderten relativ große Probemengen. Die Entwicklung von Muskelbiopsienadeln zu wiederholten Entnahmen kleiner Proben aus dem menschlichen Skelettmuskel machte aber empfindlichere Methoden zur Bestimmung des Glykogen-Gehalts notwendig. HULTMAN (47) berichtete über ein geeignetes Verfahren. Der Gewebsaufschluß erfolgt durch Homogenisieren in TCA, Glykogen wird nach Zugabe von absolutem Alkohol durch Kühlung über 12 h im Eisbad gefällt und in Schwefelsäure über 3 h bei 120°C hydrolysiert. Colorimetrische Glucosebestimmung nach der o-Toluidinmethode schließt sich an. EHRENSTEIN et al. (30) modifizierten diese Methode. Homogenisierung und Proteinfällung in TCA wurden durch Erhitzen der Muskelprobe in KOH ersetzt. Für die Reaktionsschritte nach der Auflösung des glykogenhaltigen Niederschlags in Schwefelsäure wurde das im Handel erhältliche Mikrolitersystem "Eppendorf" (Fa. Netheler & Hinz, Hamburg)

verwendet. Der bei der Hydrolyse in heißer Schwefelsäure (90°C) auftretende Verdunstungsverlust wurde durch Wiegen ermittelt. Die Glucosebestimmung erfolgte mit der spezifischen Hexokinase-G-6-P-Dehydrogenase-Methode (Test-satz Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim).

Als Bezugsgröße wählten beide Autoren das Muskelfeuchtgewicht und gaben den Glykogengehalt in g Glykogen/100 g Muskel (= g%) an. Zur Ermittlung des Feuchtgewichts wurde die Muskelprobe sofort nach der Entnahme von Blut, Fett und Bindegewebe befreit, zur Durchführung von Doppelbestimmungen in zwei etwa gleich große Hälften geteilt und jede Hälfte an einem Platinhäkchen hängend gewogen. Da in der Zeit zwischen Entnahme und Wägung ein beträchtlicher Gewichtsverlust auftritt, schlug HULTMAN (47) vor, 2 bis 4 mal zu festgelegten Zeitpunkten zu wiegen, die Zeit von der Entnahme bis zur Beendigung der Wägung zu messen und das Feuchtgewicht zum Entnahmezeitpunkt t_0 durch lineare Extrapolation zu ermitteln.

6.3 Verbesserung der Bestimmungstechnik

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren die beiden angegebenen Verfahren nicht voll verwendbar. Eine geeignete Modifikation der Methode mußte ausgearbeitet werden.

6.31 Einfrieren der Muskelprobe

Nach 15 sec dauernder Ischämie des Muskels wird eine Aktivierung der Phosphorylase von 0 auf 55 % der Maximalaktivität gefunden (112). Es muß daher sofort nach der Entnahme der Muskelprobe mit einem verstärkten Glykogenabbau gerechnet werden. HULTMAN (47) beobachtete 10 min nach der Probenentnahme noch keine signifikante Verminderung des Glykogengehalts. Da die verwendete Bestimmungsmethode mit einem Fehler von 7,1 % behaftet ist (s. Abschn. 6.52), können geringfügige Änderungen, die jedoch die Reproduzier-

barkeit und Richtigkeit der Ergebnisse bereits nicht unwesentlich beeinträchtigen, nicht erfaßt werden. Eine Unterbindung der Glykogenolyse wird aber durch sofortiges Einfrieren der Muskelprobe erreicht. In der Tiefkühltruhe kann das Untersuchungsgut über längere Zeit aufbewahrt werden, ohne daß Veränderungen des Glykogengehalts zu erwarten sind. Dadurch wird auch die Durchführung von Serienuntersuchungen erleichtert, da die Muskelproben mehrerer Versuchstage gesammelt und zu einem späteren Zeitpunkt gemeinsam analysiert werden können.

6.32 Gefriertrocknung

Es erscheint fraglich, ob der Gewichtsverlust während der Entfernung von Blut, Fett und Bindegewebe und während des Wiegens ausreichend durch eine Gerade (47) beschrieben wird. Darüberhinaus wird der Flüssigkeitsgehalt der Probe durch die Entnahmetechnik (lokale Gefäßläsionen, Fingerdruck) beeinflusst. Das Feuchtgewicht ist folglich eine relativ inkonstante Bezugsgröße. Trocknet man die Proben in einer einfachen Gefriertrockenanlage und schmilzt sie anschließend zur Vermeidung nachträglicher Wasseraufnahme in Glasröhrchen ein, so kann das Muskeltrockengewicht als eine von den genannten Störfaktoren unabhängige Bezugsgröße bestimmt werden. Die Reproduzierbarkeit der Methode wird dadurch verbessert (vgl. Abschn. 6.52).

6.33 Verwendung des Mikrolitersystems "Eppendorf"

Die Verwendung des Mikrolitersystems "Eppendorf" im zweiten Teil der Analyse (Glykogenhydrolyse und Glucosebestimmung) vereinfacht die Arbeitsgänge beträchtlich (30). Das System besteht aus Einweg-Plastikgefäßen mit Deckel, geeichten Mikroliterpipetten und Einmalspitzen sowie dazu passendem Thermostaten, Rotationsrüttler und einer Laborzentrifuge. Alle Teile sind so aufeinander abgestimmt,

daß sie rasches Arbeiten ermöglichen. Um die Methode weiter zu vereinfachen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch der erste Teil der Analyse (Gewebsaufschluß und Glykogenextraktion) in Mikrolitergefäßen durchgeführt. Die Schwierigkeiten beim Dekantieren wurden durch das in Abschn. 6.410 beschriebene Verfahren beseitigt. Beim Erhitzen der schwefelsauren Glykogenlösung in Plastikgefäßen tritt ein beträchtlicher Verdunstungsverlust auf, den EHRENSTEIN et al. (30) durch Wiegen vor und nach der Hydrolyse rechnerisch ausglich. Dieses zeitraubende und relativ ungenaue Verfahren wurde durch günstige Bemessung der Flüssigkeitsvolumina vermieden; bei Verwendung der in Abschn. 6.47 angegebenen Volumina beträgt der durch Verdunstung bedingte Fehler weniger als 1 % und kann somit vernachlässigt werden.

6.34 Verkürzung der Analysenzeit

Der Zeitaufwand der chemischen Analyse beträgt bei HULTMAN (47) mehr als 18 h, bei EHRENSTEIN et al. (30) ca. 16 h. Dies ist vor allem auf die Kühlung der alkoholischen Lösung über 12 h zurückzuführen, die für die vollständige Glykogenpräzipitation notwendig ist. Verwendung von Natriumsulfat als Kopräzipitat (36, 80) erübrigt eine Kühlung. Darüberhinaus verkürzt sich bei den angegebenen Konzentrations- und Temperaturverhältnissen die Hydrolysezeit, so daß aus allem ein Gesamtzeitbedarf von ca. 2,5 h resultiert.

6.4 Beschreibung der modifizierten Methode

6.41 Geräte

Benötigt werden:

- Glasröhrchen von 7 cm Länge, ca. 2 mm Innendurchmesser und ca. 0,5 mm Wandstärke zur Aufbewahrung der Muskelproben,
- ein Röhrchenständer, z.B. Aluminiumblock mit nummerierten Bohrungen zur Aufbewahrung und Kennzeichnung der Röhrchen,

- ein stumpfer Draht, Durchmesser ca. 1,5 mm, zum Herausstoßen der Muskelproben aus den Röhrchen,
- ein Gefriertrockengerät, bestehend z.B. aus einem Glasrechen mit Gefäßen zur Aufnahme der Röhrchen, zwei mit flüssiger Luft beschickten Kühlfallen und Vakuumpumpe,
- eine Halbmikrowaage, auf der mindestens 10 μg ablesbar sind,
- ein nicht "fusselndes" Antistatiktuch und
- eine Ampullensäge,
- das Mikrolitersystem "Eppendorf" (Fa. Netheler & Hinz, Hamburg), bestehend aus Mikropipetten "Marburg" (5 bis 1000 l), einem Thermostaten mit Wechselaufsätzen, einer Mikrozentrifuge, einem Rotationsrüttler und Teströhrchen aus transparentem Kunststoff (1,5 ml Fassungsvermögen) mit Deckel,
- ein Photometer (366 nm) mit Mikroküvette (1 cm Schichtdicke).

6.42 Chemikalien

- KOH reinst, Plättchen
- NaOH reinst, Plättchen
- Äthanol 96 %
- Na_2SO_4 p.A., wasserfrei
- H_2SO_4 konz., p.A.
- Hexokinase-G-6-P-Dehydrogenase-Testsatz zur Glucosebestimmung (z.B. Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim) bestehend aus Triäthanolaminpuffer, NADP, ATP, Hexokinase und G-6-P-Dehydrogenase,
- gereinigtes Glykogen (z.B. Glykogen A, Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim).

6.43 Herzustellende Lösungen

- 30 % KOH (300 g zu 1000 ml lösen)
- 7,5 n NaOH
- gesättigte Na_2SO_4 -Lösung
- 3 n H_2SO_4
- Glykogen-Standardlösung (10 mg Glykogen in 10 ml dest. H_2O lösen)
- Glucosetestsatz nach Werksvorschrift.

6.44 Vorbereiten der Muskelprobe und Gefriertrocknung

Die bioptisch entnommene Muskelprobe auf ein Stück Filterpapier legen und zur Entfernung eventuell anhaftenden Blutes mehrfach wenden - von sichtbarem Fett und Bindegewebe befreien (2 Pinzetten) und halbieren - jede Hälfte (1 bis 3 mg; vgl. Abschn. 6.410) mit Pinzette und Draht in die Mitte eines Glasröhrchens einbringen und in der Tiefkühltruhe einfrieren - im Gefriertrockengerät Muskelproben 10 min trocknen - anschließend Glasröhrchen zur Vermeidung nachträglicher Wasseraufnahme an beiden Enden in der Bunsenbrennerflamme zuschmelzen und in der Tiefkühltruhe aufbewahren -.

6.45 Wägung

Röhrchen zu beiden Seiten der Muskelprobe ansägen und aufbrechen - Mittelstück mit Antistatiktuch trocken reiben und wiegen (Gewicht G_1) - Muskelprobe in ein nummeriertes Plastikgefäß stoßen - Gefäß verschließen und gekühlt aufbewahren - Mittelstück leer wiegen (Gewicht G_2) -.

6.46 Gewebsaufschluß und Glykogenextraktion

Noch 2 Reaktionsgefäße für Leerwert und Standard aufstellen - einpipettieren:

	Leerwert	Standard	Muskelprobe	Eichkurve
KOH 30 % (μ l)	200	200	200	200
Standardlösung (μ l)	-	50	-	20, 50, 70, 100

Die Muskelproben müssen ganz von KOH bedeckt sein (evtl. 1 min zentrifugieren.

15 min auf 95°C erhitzen (vgl. 6.410) - während dieser Zeit 1 bis 2 mal kurz durchschütteln - 30 sec zentrifugieren - 20 μ l gesättigte Natriumsulfatlösung zugeben - 5 min schütteln (Rotationsrüttler) - 2 min zentrifugieren (vgl. 7.410) - Überstand dekantieren - 30 sec zentrifugieren - Überstand mit Mikropipette absaugen - 50 μ l H_2SO_4 zugeben - 5 min schütteln (Rotationsrüttler) -.

6.47 Glykogenhydrolyse

In neue Reaktionsgefäße 50 μ l Überstand einpipettieren - für jede Muskelprobe ist eine Doppelbestimmung anzusetzen - 60 min im Thermostaten auf 95°C erhitzen (vgl. 6.410) -.

6.48 Glucose-Bestimmung

Bei Verwendung des Testsatzes der Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim Reaktionsgemisch wie folgt herstellen:
Für je 10 Bestimmungen 5 ml Pufferlösung, 200 μ l ATP, 200 μ l NADP, 50 μ l Enzymlösung (Reaktionsgemisch frisch verwenden!) - Hydrolysat 30 sec zentrifugieren - 20 μ l NaOH und 500 μ l Reaktionsgemisch in dieser Reihenfolge zugeben - nach genau 15 min Extinktion bei 366 nm messen (1 cm Schichtdicke) -.

6.49 Berechnung des Glykogen-Gehalts

Für jede Muskeleinzelbestimmung werden 2 Extinktionen M_1 und M_2 erhalten, für die Leerwerte die Extinktionen L_1 und L_2 , für den Standard die Extinktionen S_1 und S_2 . Die arithmetischen Mittel werden im folgenden mit M , L und S bezeichnet. Der Glykogengehalt in g/100 g Muskel-trockengewicht errechnet sich nach Gleichung 1:

$$\text{Glykogengehalt} = \frac{M - L}{(S - L) \times (G_1 - G_2)} \times F \times 50 \mu\text{g Glykogen} \quad [1]$$

Werden G_1 und G_2 (vgl. Abschn. 6.45) in μ g eingesetzt, so beträgt $F = 100$.

Zur überschlägigen Umrechnung der erhaltenen Größe in g/100 g Muskelfeuchtgewicht wird Gleichung 2 angewendet:

$$\text{Glykogengehalt}_{\text{feucht}} = \frac{100 - \text{Wassergeh. in } \%}{100} \times \text{Glykogengeh.}_{\text{trocken}} \quad [2]$$

6.410 Anmerkungen

Das Probengewicht sollte bei einer Gefriertrocknungsdauer von 10 min nicht mehr als 3 mg betragen (s. Abb. 3). Ein

Aufspringen der Plastikgefäßdeckel im Thermostaten wird durch Beschweren mit einer Eisenplatte vermieden.

Um den Glykogen-Niederschlag an einer Stelle des Plastikgefäßbodens zu halten und zu vermeiden, daß er sich diffus an der Gefäßwand verteilt, müssen die Gefäße bei beiden Zentrifugengängen der Präzipitation gleich orientiert sein, am besten dadurch, daß die Plastikgefäße so in den Rotor der Zentrifuge gesteckt werden, daß die Befestigungslasche des Deckels stets zur Zentrifugenmitte weist.

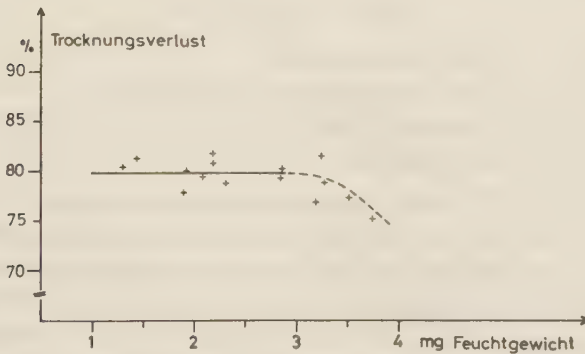


Abb. 3: Prozentualer Gewichtsverlust von 15 Muskelproben bei einer Gefriertrocknungsdauer von 10 min.

6.5 Ergebnisse

6.51 Eichkurven

Als Eichsubstanz wurde Glykogen A (Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim verwendet, das laut Werksangabe 90 % Glykogen enthält (enzymatische Reinheitsprüfung mit Amyloglucosidase). Die Berechnung der Wiederfindungsrate des hier angegebenen Verfahrens unter Zugrundelegung des enzymatisch bestimmten Glykogengehalts in der Standardsubstanz liefert

einen Vergleich zwischen der Ausbeute der Säurehydrolyse und der enzymatischen Hydrolyse. Eine Wiederfindungsrate von 100 % bedeutet, daß beide Verfahren gleiche Ausbeuten ergeben.

Die Ausbeute in % der eingesetzten Glykogenmenge wurde wie folgt erhalten: Der theoretisch zu erwartende Wert für die Steigung $\tan \alpha$ der Eichkurve läßt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz errechnen, das den Zusammenhang zwischen der Konzentration des zu messenden Stoffes und der durch diesen verursachten Extinktionsänderung beschreibt:

$$\Delta E = \epsilon \cdot d \cdot c \quad [3]$$

mit ΔE = Extinktionsänderung

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtlänge und

c = Konzentration.

Bei dem vorliegenden Analysenverfahren wird pro M Glucose des Hydrolysats durch die G-6-P-Dehydrogenase-Reaktion 1 M NADP reduziert und die Konzentrationszunahme von NADPH in der Küvette photometrisch gemessen. Die Menge an gebildetem NADPH (in M) ist somit gleich der aus Glykogen freigesetzten molaren Glucosemenge, wenn diese vollständig oxydiert wird.

Der Umrechnungsfaktor F zwischen Extinktionsänderung und eingesetzter Substanzmenge errechnet sich dann aus der Gleichung

$$F = \frac{1}{\epsilon \cdot d} \times \text{Küvettenvolumen} \times \text{Molekulargewicht} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad [4]$$

und beträgt für die vorliegende Bestimmungsmethode 0,295 g Glykogen, d.h. eingesetzte Glykogenmenge = $\Delta E \times 0,295$. Die Formel wurde von MATTENHEIMER (69) entnommen. Der Faktor 0,295 ist identisch mit der theoretischen Steigung der Eichgeraden. Die tatsächliche Steigung läßt sich aus der Eichkurve graphisch ermitteln oder besser als den Regressionskoeffizienten errechnen (94). Sind theoretische und

tatsächlich erhaltene Steigung numerisch gleich, so beträgt die Ausbeute der Analyse 100 %. Unterscheidet sich der theoretische Faktor F vom praktisch ermittelten Faktor F', so gilt:

$$\text{Ausbeute (\%)} = \frac{F}{F'} \times 100 \quad [5]$$

denn:

$$\text{Ausbeute (\%)} = \frac{M'}{M} \times 100 \quad [6]$$

wobei M die eingesetzte Glykogenmenge, M' die wiedergefundene Menge sei. M und M' errechnen sich nach den Gleichungen:

$$\begin{aligned} M &= F' \times \Delta E & \text{und} \\ M' &= F \times \Delta E \end{aligned}$$

wobei ΔE die tatsächlich gefundene Extinktionsdifferenz aus Proben- und Leerwertextinktion sei. Durch Einsetzen von M und M' in Gleichung [6] erhält man Gleichung [5].

Um diejenige Hydrolysezeit zu ermitteln, bei der die höchste Ausbeute erzielt wird, wurden 3 Eichkurven aufgestellt. Die schwefelsaure Glykogen-Lösung wurde jeweils 30, 60 bzw. 120 min auf 95°C erhitzt. Die Regressionskoeffizienten, Korrelationskoeffizienten und Ausbeuten der 3 Eichkurven sind in Tab. 1 zusammengefaßt:

Hydrolysezeit (min)	Regress.- Koeff.	Korr.- Koeff.	Ausbeute %
30	0,305	0,999	96,6
60	0,293	0,999	100,7
120	0,315	0,999	93,6

Tab. 1: Regressionskoeffizient, Korrelationskoeffizient und Glucoseausbeute dreier Eichkurven bei Hydrolysezeit von 30, 60 und 120 min.

Bei der Berechnung der Regressionskoeffizienten wurde berücksichtigt, daß das Standardpräparat nach enzymatischer Analyse 90 % Glykogen enthält. Aus Tabelle 1 wird ersicht-

lich, daß bei einer Hydrolysedauer von 60 min die Säurehydrolyse unter den angegebenen Bedingungen eine ebenso hohe Ausbeute liefert wie die enzymatische Hydrolyse.

Aus den Doppelbestimmungen von 6 Eichkurven mit einer Hydrolysedauer von 60 min wurden folgende, in Tab. 2 zusammengestellten, statistischen Maßzahlen erhalten:

eingesetzte Menge der Standardsubstanz	Standard- abweichungen	Variabilitäts- koeffizient
20 μg	0,82 μg	4,1 %
50 μg	1,39 μg	2,8 %
70 μg	1,64 μg	2,3 %
100 μg	2,94 μg	2,9 %

Tab. 2: Statistische Maßzahlen, erhalten aus jeweils 6 Doppelbestimmungen verschiedener Glykogen-einwaagen.

Die Standardabweichung für Doppelbestimmungen wurde errechnet nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - x_2)^2}{2n}} \quad [7]$$

Die übrigen verwendeten Formeln sind den Lehrbüchern der Statistik, z.B. SACHS (94) zu entnehmen.

6.52 Muskelglykogenbestimmung

Muskelproben unterschiedlichen Gewichts wurden nach dem in Abschn. 6.44 angegebenen Verfahren 10 min lang getrocknet. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, betrug der Gewichtsverlust bei Proben bis zu 3 mg Feuchtgewicht 77,9 - 80,7 %. Dies entspricht mit guter Näherung dem in der Literatur angegebenen Normwassergehalt des menschlichen Skelettmuskels von 79 % (110).

Für die Wägung der Muskelproben errechnete sich aus 30 Doppelwägungen eine Standardabweichung von 3,3 μg , was

bei einem mittleren Trockengewicht von $671,5 \mu\text{g}$ einem Variationskoeffizienten von $0,5 \%$ entspricht.

Um die Standardabweichung für die Gesamtanalyse (Wägung + chemische Analyse) zu ermitteln, wurde 8 Vpn aus dem ruhenden M. quadriceps femoris je 1 Muskelprobe entnommen und der Glykogengehalt nach dem angegebenen Verfahren bestimmt. (Die im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden zwar an 9 Vpn durchgeführt, doch konnte der Ruheglykogengehalt der Vp 8 aus technischen Gründen nur einfach bestimmt werden). Aus den Doppelbestimmungen errechnet sich eine Standardabweichung von $s = 0,20 \text{ g}/100\text{g}$ Muskeltrockengewicht. Dann ist $s' = 0,040 \text{ g}/100 \text{ g}$ Muskelfeuchtgewicht (berechnet für einen mittleren Wassergehalt von 80% nach der in Abschn. 6.49 angegebenen Gleichung [2]). Bezogen auf einen mittleren Glykogengehalt von $1,39 \text{ g}/100 \text{ g}$ Feuchtgewicht (46) beträgt dann der Variationskoeffizient $v = 2,9 \%$.

6.53 Verwendbarkeit der Methode im Routinebetrieb

Die Methode wurde für die im experimentellen Teil beschriebenen Untersuchungen eingesetzt. Unabhängigkeit von Biopsie und Analyse war für die Durchführung der Versuche eine unerläßliche Voraussetzung, da neben der Glykogenuntersuchung zahlreiche weitere Parameter an denselben Vpn gemessen wurden (62), so daß eine möglichst rationelle Versuchsplanung nötig war. Diese Unabhängigkeit wurde durch das sofortige Einfrieren der Muskelproben erreicht. Die einzelnen Arbeitsgänge der chemischen Analyse sind so angeordnet, daß mehrere Serien von Muskelproben zeitlich gestaffelt analysiert werden können. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse genügt, um die relativ geringen Schwankungen des Glykogengehalts unter Dauerleistungsbedingungen hinreichend genau zu erfassen. Die Methode ist somit für den Routinebetrieb geeignet.

B. II. Experimenteller Teil

7. Versuchsaufbau

Im Rahmen der Untersuchung von KRETSCHMER (Diss. Univ. München, 62) wurde an 18 männlichen Vpn der Einfluß einer oralen Glucosegabe auf den Arbeitsstoffwechsel des Menschen unter Dauerleistungsbedingungen untersucht. Als Parameter wurden Blutglucose, Laktat, unveresterte Fettsäuren, Insulin und der respiratorische Quotient gemessen. 9 dieser Probanden nahmen gleichzeitig an der vorliegenden Versuchsserie teil.

7.1 Material

Vor Beginn der Versuche wurde von jeder Vp eine sorgfältige Anamnese erhoben. Am Abend vor dem ersten Versuchstag wurde der Blutdruck gemessen und ein Ruhe-EKG (Extremitätenableitung) aufgenommen. Alle ausgewählten Vpn waren gesund. In Tab. 3 sind Alter, Körpergröße und Gewicht der Probanden zusammengefaßt.

Vp	Alter (Jahr)	Größe (cm)	Gewicht (kg)
1	22	172	56
2	27	180	67
3	24	183	74
4	22	181	78
5	23	178	74
6	23	171	72
7	20	178	70
8	19	172	61
9	19	181	70

Tab. 3: Alter, Körpergröße und Gewicht der Vpn.

7.2 Methoden

7.2.1 Fahrradergometer

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Fahrrad-ergometer nach E.A. MÜLLER (43) verwendet, das auf dem Prinzip der Wirbelstrombremsung beruht. Eine von der Vp über Pedale in Rotation versetzte Kupferscheibe taucht in das Feld eines Permanentmagneten ein. Durch Veränderung der Eintauchtiefe kann die von der Vp zu erbringende Leistung bei konstanter Drehzahl stufenlos variiert werden. Die in den vorliegenden Untersuchungen gewählte Umdrehungszahl von $U = 60 \text{ min}^{-1}$ hielt die Vp über einen optischen Schrittmacher konstant.

7.2.2 Pulsfrequenzmessung

Mit 3 Klebeelektroden wurden die dem EKG entsprechenden Spannungsänderungen über dem Herzen abgeleitet. Als Triggerimpulse für die Pulsmessung dienten die den R-Zacken des EKG entsprechenden Spannungsspitzen. Die kontinuierliche Aufzeichnung erfolgte über einen Cardiotachometerkoppler mit einem Dynographen (Fa. Beckman, Typ R) als Puls-zu-Puls-Analogkurve.

7.2.3 Messung der Sauerstoffaufnahme

Die Vp wurde^o über eine Kunststoffmaske mit dem geschlossenen System "Magnatest", Typ 510 (Fa. Dargatz, Lübeck) verbunden. Die Vp entnimmt dem System O_2 und gibt CO_2 ab. Durch CO_2 -Absorption an Natronkalk und Nachfuhr von O_2 aus einem Nachfüllbehälter wird die Zusammensetzung der Atemluft konstant gehalten. Die pro Zeiteinheit aufgenommene O_2 -Menge ergibt sich aus der graphisch registrierten Abnahme des Sauerstoffvolumens im Nachfüllbehälter. Atemvolumina wurden auf BTPS-Bedingungen (body-temperature pressure soft = $37^\circ C$, Gasdruck im Körper, Wasserdampfsättigung), die Sauerstoffaufnahme auf STPD-Bedingungen (standard temperature pressure dry = $0^\circ C$, 760 Torr, trocken) umgerechnet.

7.24 Glykogen-Bestimmung

Allen 18 Vpn, die an den Untersuchungen von KRETSCHMER (62) teilnahmen, wurden nach dem Verfahren von BERGSTRÖM (8) Muskelproben zur Glykogen-Bestimmung entnommen. Die Proben der ersten 9 Vpn wurden nach dem von EHRENSTEIN et al. (30) angegebenen Verfahren analysiert. Da jedoch die durch die relativ leichte Arbeit verursachten Veränderungen des Glykogengehalts nur gering waren, genügte die Reproduzierbarkeit der Methode nicht, um diese Schwankungen hinreichend genau zu erfassen. Die Muskelproben der übrigen 9 Vpn wurden nach der im ersten Teil der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode analysiert. Die so erhaltenen Werte genügten den in Abschn. 6.53 genannten Anforderungen und wurden statistisch ausgewertet.

7.25 Statistische Auswertung

Zur Erstellung der Mittelwertskurven wurden die arithmetischen Mittel und Standardabweichungen der Einzelwerte errechnet. Unterschiede der Mittelwerte wurden ausnahmslos mit dem t-Test für abhängige Stichproben abgesichert. Lineare Wechselbeziehungen zwischen zwei Größen beschreiben der Regressionskoeffizient und der Korrelationskoeffizient. Der Ausreißertest nach DIXON (29) findet in Abschn. 8.43 Anwendung. Die Berechnungen wurden nach den im Lehrbuch von SACHS (94) angegebenen Formeln durchgeführt.

7.3 Vorversuch

Im Vorversuch wurde für jede Vp gesondert die Leistung ermittelt, die während der Hauptversuche (s.u.) erbracht werden sollte. Zur Bestimmung der maximalen O_2 -Aufnahme fuhr die Vp auf dem Fahrradergometer bei stufenförmig ansteigender Belastung bis zur Erschöpfung. Die Leistung wurde, bei 40 W beginnend, nach jeweils 3 min um je 30 W erhöht. Die Ablesung der O_2 -Aufnahme erfolgte nach der

3. min jeder Stufe. Dieses Vorgehen gestattet eine Messung der Atmungsparameter unter steady-state-Bedingungen (43).

O₂-Aufnahme und zugehörige Leistung wurden in ein Diagramm eingetragen und diejenige Leistung, die 50 % der maximalen O₂-Aufnahme entsprach, graphisch ermittelt. Die Vpn wurden somit individuell unterschiedlich nach Maßgabe ihrer körperlichen Leistungsfähigkeit belastet, so daß durch den Trainingszustand bedingte Unterschiede die Vergleichbarkeit der Ergebnisse kaum beeinträchtigten. Das verwendete Verfahren wurde von HOLLMANN (43) zur Bestimmung der sog. O₂-Dauerleistungsgrenze (s. Abschn. 11) angegeben.

7.4 Hauptversuche

In den beiden Hauptversuchen erbrachten die Vpn die im Vorversuch ermittelte Leistung über einen Zeitraum von jeweils 120 min. Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, verbrachten die Probanden die Nacht vor jedem Versuch im Institut und nahmen ein standardisiertes Frühstück ein, das aus zwei Tassen Milch, zwei Buttersemmeln mit Marmelade und einem Ei bestand. Der Energiegehalt dieses Frühstücks errechnet sich zu etwa 680 kcal, enthalten in ca. 65 g Kohlenhydraten, 35 g Fett und 20 g Eiweiß. Die Vpn waren angehalten, vor und zwischen den Versuchen ihre Lebensgewohnheiten beizubehalten und stärkere körperliche Anstrengung zu vermeiden.

7.41 Arbeitsversuch

Der erste der beiden Hauptversuche wird im folgenden als Arbeitsversuch (AV) bezeichnet. Der Versuchsplan ist aus Abb. 4 ersichtlich.

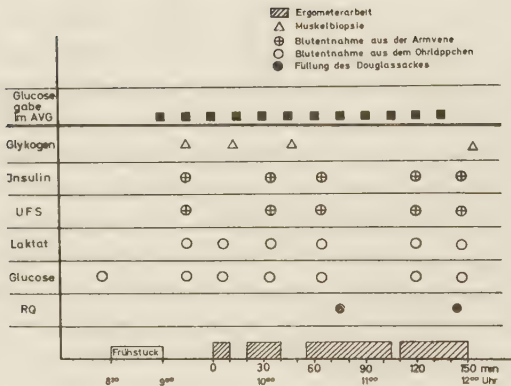


Abb. 4: Versuchsplan der 2 Hauptversuche AV und AVG

Für jede der 4 Biopsien wurde mit einem Zeitbedarf von 15 min gerechnet, für die zweite mit nur 10 min, da die ersten zwei Lokalanästhesien gleichzeitig vor Versuchsbeginn gelegt werden konnten. Die erste Muskelentnahme erfolgte unmittelbar vor Arbeitsbeginn, die zweite in der ersten Pause. Es folgten 20 min Arbeit und 15 min Pause für die 3. Biopsie. Das letzte Arbeitsintervall von 95 min Dauer wurde durch eine Pause von 5 min unterbrochen, in der sich die Vp frei bewegen durfte. Die 4. Muskelbiopsie wurde nach Arbeitsende entnommen. Abb. 4 gibt zusätzlich einen Überblick über die Entnahmezeitpunkte, die für die Messung der übrigen Parameter (62) notwendig waren.

7.42 Arbeitsversuch mit oraler Glucosegabe

Der zweite Hauptversuch wird im folgenden abgekürzt als AVG bezeichnet. Der Zeitplan entsprach dem des AV. Zusätzlich wurde eine 30 %-ige wässrige Glucoselösung

(Dextro med^R, Fa. Maizena, Hamburg) mit Zusatz von 0,1 % Citronensäure und 1 % Hibiskusteepulver zur Geschmacks-korrektor p.o. verabreicht. Jede Vp erhielt diejenige Glucosemenge, die in etwa der während der Arbeit verbrauchten Energie entsprach. Unter Annahme eines Wirkungsgrades von 23,5 % (77) und unter Berücksichtigung des Brennwertes von 3,75 kcal/g Glucose (56) errechnete sich die verabfolgte Glucosemenge für die jeweilige Leistung nach der Gleichung [8]:

$$\text{Glucose (g)} = \frac{\text{Leistung (mkp/sec)} \times \text{Arbeitsdauer (sec)}}{\text{Wirkungsgrad} \times \text{Brennwert (kcal/g)} \times 427(\text{mkp/kcal})} \quad [8]$$

wobei 427 mkp/kcal den Umrechnungsfaktor von mechanischen in calorische Energieeinheiten darstellt.

Die Gesamtmenge wurde in 12 gleichen Teilen alle Viertelstunden gegeben, wobei mit der ersten Gabe 30 min vor Anfang der Ergometerarbeit begonnen wurde (s. Abb. 4). Am Versuchsende wurde auf Glucosurie geprüft (Komburtest, Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim).

In Tab. 4 sind die nach Gleichung [8] errechneten Glucosemengen zusammengestellt. Die angegebenen Werte stellen gerundete Zahlen dar, da es nicht sinnvoll war, die verabreichte Glucosemenge auf 0,1 g genau abzuwiegen. Den Werten für die verbrauchte Energie liegen die Zahlen der Tab. 5 zugrunde.

Vp	verbrauchte Energie (mkp x 10 ³)	Glucosemenge (g)
1	63	168
2	75	190
3	83	220
4	63	168
5	86	229
6	60	160
7	99	262
8	77	212
9	99	262

Tab. 4: Im AVG verbrauchte Energie und verabreichte Glucosemenge

8. Ergebnisse

8.1 Sauerstoffaufnahme und Ergometerleistung

Die im Vorversuch ermittelte maximale O_2 -Aufnahme betrug im Mittel $2,99 \pm 0,48$ l/min. Die Leistung, die 50 % der maximalen O_2 -Aufnahme entsprach, lag im Durchschnitt $11,0 \pm 1,9$ mkp/sec. Die Einzelwerte sind in Tab. 5 aufgeführt.

Die experimentell ermittelte maximale O_2 -Aufnahme stimmt mit dem anamnestisch erfaßten Trainingszustand überein. Diejenigen Vpn, die die höchsten Werte erzielten (Nr. 5, 7, 9), trainierten als Sportstudenten regelmäßig.

Vp	max. O_2 -Aufnahme (l/min)	Leistung (mkp/sec)
1	2,56	8,8
2	2,80	10,4
3	2,97	11,5
4	2,50	8,8
5	3,17	12,0
6	2,90	8,4
7	3,42	13,7
8	2,77	11,1
9	3,23	13,7

Tab. 5: Im Vorversuch ermittelte maximale Sauerstoffaufnahme und Ergometerbelastung der Versuchspersonen.

8.2 Pulsverhalten

Vor Beginn des AV wurde ein mittlerer Ruhepuls von $68,3 \pm 8,3$ gemessen. Der Ruhepuls vor dem AVG lag mit $67,2 \pm 7,5$ im selben Bereich. In beiden Versuchen wurde zu Arbeitsbeginn ein rascher Pulsfrequenzanstieg auf $105 \pm 36,3$ bzw. $113,3 \pm 11,5$ registriert. Die Frequenz stieg im Verlauf des Versuchs bei allen Vpn an, im Mittel bis auf $147,8 \pm 10,9$ bzw. $137,2 \pm 10,0$ zu Arbeitsende. Die höchste Pulsfrequenz erreichte Vp 9

mit 170 min^{-1} am Ende des AV, die niedrigste Vp 1 mit 120 min^{-1} am Ende des AVG. Ein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Pulsfrequenz im AV und AVG war zu keinem Zeitpunkt zu beobachten.

8.3 Glucosurie

Da im AVG relativ hohe Glucosegaben verabreicht wurden (vgl. Tab. 4), wurde nach Beendigung des Versuchs überprüft, ob diese Glucose im Organismus verblieb oder zum Teil über den Urin ausgeschieden wurde. Die Prüfung (Teststreifen der Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim) fiel bei allen Vpn negativ aus.

8.4 Glykogenverhalten im Musculus quadriceps femoris

8.41 Veränderung des Glykogengehalts bei Arbeit

In Tab. 6 sind die Einzelwerte des Glykogen-Gehalts im M. vastus lateralis aller 9 Vpn im AV nach 0, 10, 30 und 120 Arbeitsminuten mit Mittelwerten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten zusammengestellt. Die Einzelwerte stellen das arithmetische Mittel aus Doppelanalysen derselben Muskelprobe dar.

Vp	Glykogengehalt nach Arbeit von			
	0 min	10 min	30 min	120 min
1	5,85	5,74	5,20	5,46
2	7,88	5,99	5,48	3,68
3	7,31	6,74	7,31	6,09
4	7,23	7,92	4,89	4,51
5	9,74	12,50	10,36	8,26
6	4,07	4,91	5,01	3,26
7	5,44	6,81	5,38	2,68
8	6,20	6,84	5,35	4,37
9	9,25	9,21	7,09	5,76
Mittelwert	7,00	7,41	6,23	4,90
Standardabweichg.	1,82	2,28	1,78	1,71
Variationskoeffizient	26,0%	30,8%	29,1%	34,9%

Tab. 6: Glykogenkonzentration im Arbeitsversuch

Die Ausgangswerte zum Zeitpunkt $t = 0$ stellen echte Ruhewerte dar, da den Probanden, die die Nacht vor dem Versuch im Institut verbrachten, zwischen dem Aufstehen und der ersten Biopsie keine anstrengende körperliche Betätigung gestattet war. Bei der in der vorliegenden Versuchsserie erbrachten Arbeit an der Dauerleistungsgrenze ist nach 10 min der Glykogen-Spiegel nicht signifikant verändert. Erniedrigten Glykogen-Konzentrationen um bis zu 24 % (Vp 2) gegenüber dem Ruhewert stehen erhöhte Meßwerte um bis zu 25 % (Vp 7) bzw. 28 % (Vp 5) gegenüber, so daß keine einheitliche Tendenz resultiert. Auch nach Arbeit von 30 min ist der Glykogen-Spiegel nur insignifikant erniedrigt. Erhöhte Einzelwerte um bis zu 23 % (Vp 6) bedingen, daß die mittlere Differenz von 0,77 g/100 g Muskelrockengewicht statistisch nicht zu sichern ist. Erst der Meßwert zum Zeitpunkt $t = 120 \text{ min}$ - also zu Arbeitsende - ist gegenüber dem Ruhewert signifikant erniedrigt ($p < 0,01$). Im Mittel wurden während der 2 h dauernden Ergometerarbeit 30 % des mittleren Glykogenvorrats abgebaut.

Die beobachteten interindividuellen Unterschiede in der Glykogen-Utilisation korrelieren nicht mit dem Trainingszustand der Probanden.

Die in Tab. 6 zusammengestellten Standardabweichungen und besonders die Variationskoeffizienten zeigen eine starke Streuung der Einzelwerte um den jeweiligen Mittelwert. Bereits die Ruhewerte weisen große Unterschiede auf. Die errechnete Standardabweichung, die 26,0 % des Mittelwertes beträgt, geht in alle übrigen Meßwerte zusätzlich zu der arbeitsbedingten Streuung ein. Um die ausschließlich arbeitsbedingten Änderungen besser beurteilen zu können, wurden für die Kurve in Abb. 5 die Ruhewerte gleich 0 gesetzt und die Vertrauensbereiche der mittleren Relativwerte bei 10, 30 und 120 min eingezeichnet.

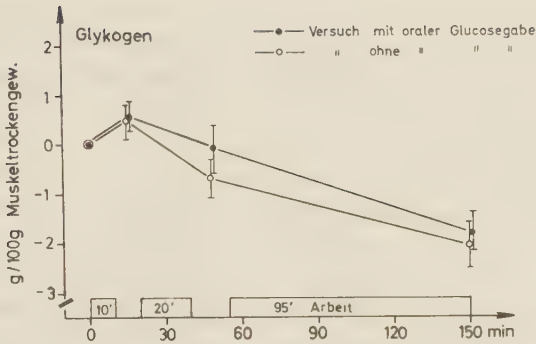


Abb. 5: Glykogen-Relativwerte in den 2 Hauptversuchen, bezogen auf den jeweiligen Ruheglykogen-Gehalt des M. quadriceps femoris.

Aus Abb. 5 geht hervor, daß die Standardabweichungen zunehmen. Dies zeigt, daß mit steigender Dauer der Belastung die interindividuellen Unterschiede in der Glykogen-Utilisation stärker hervortreten. Um einen Anhalt für die intramuskulären Streuungen zu erhalten, wurden auch die Standardabweichungen aus den Doppelanalysen derselben Muskelprobe für jeden Entnahmezeitpunkt getrennt berechnet.

Entnahmezeitpunkt	O min	10 min	30 min	120 min
Standardabweichung				
im AV (g %)	0,20	0,60	0,75	0,82
im AVG (g %)	0,73	0,93	0,70	0,45
Gesamt (g %)	0,31	0,78	0,73	0,67

Tab. 7: Standardabweichungen der Glykogenbestimmung zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten.

Tab. 7 zeigt ein sprungartiges Ansteigen der Standardabweichungen im AV schon nach 10 Arbeitsminuten. Im AVG, in

dem vor der ersten Biopsie bereits 30 min lang Glucose gegeben wurde, ist ebenfalls die Streuung des Ruhewertes stark erhöht. Die Standardabweichung des Ruhewerts im AV unterscheidet sich von allen anderen tabellierten Werten hoch signifikant ($p < 0,01$). Daraus wird geschlossen, daß sich in Ruhe eine relativ gleichmäßige Glykogenkonzentration im gesamten Muskel einstellt, die sich bei exogener Beeinflussung (Arbeit, Veränderung des Glucose-Spiegels) in verschiedenen Muskelfasern unterschiedlich stark ändert. Der Fehler der Analyse kann unter dieser Voraussetzung nicht allein durch methodische Unzulänglichkeiten erklärt werden, sondern es müssen zusätzlich echte Inhomogenitäten der intramuskulären Glykogenverteilung angenommen werden.

8.42 Muskelglykogengehalt bei gleichzeitiger Glucosegabe

In Tab. 8 sind die Glykogen-Einzelkonzentrationen im AVG zusammengestellt. Sie sind wie die Angaben in Tab. 6 Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ein Vergleich der Mittelwerte des AVG mit denen des AV zeigt ein ähnliches Verhalten der Glykogen-Konzentration in beiden Versuchen. Die Mittelwerte nach 10 und 30 min Ergometerarbeit sind wie im AV vom Ruhewert nicht signifikant verschieden, da auch im AVG der Verminderung des Glykogen-Gehalts bei einigen Vpn eine Erhöhung bei anderen gegenübersteht.

Vp	Glykogen-Gehalt nach Arbeit von			
	0 min	10 min	30 min	120 min
1	7,48	7,77	6,05	4,51
2	8,30	9,02	11,02	7,13
3	6,93	6,12	6,22	5,07
4	5,63	7,16	5,11	5,27
5	8,16	9,55	9,61	7,16
6	4,26	4,19	2,85	2,05
7	4,20	3,78	3,70	3,58
8	6,32	6,26	5,30	3,57
9	6,61	7,87	6,95	2,98
Mittelwert	6,43	6,86	6,31	4,59
Standard- abweichung	1,51	1,98	2,62	1,76
Variations- koeffizient	23,3%	28,9%	41,4%	38,4%

Tab. 8: Glykogenkonzentrationen im Arbeitsversuch mit oraler Glucosegabe.

Diese interindividuellen Unterschiede liegen in derselben Größenordnung wie diejenigen zwischen den zwei jeweiligen Versuchen desselben Probanden. Vp 2, bei der in den ersten 10 min des AV ein starker Abbau beobachtet wurde, (s. auch Abschn. 8.41) hat nach derselben Zeit einen um 21 %, nach 30 min um 33 % gegen die Ruhekonzentration erhöhten Glykogen-Spiegel. Demgegenüber zeigt Vp 6 im AV nach 30 min eine Erhöhung der Konzentration um 23 %, im AVG nach derselben Zeit eine Verminderung um 33 %.

Die Glykogen-Konzentration ist nach 120 Arbeitsminuten wie im AV bei allen Vpn unter den Ruhewert abgesunken und unterscheidet sich signifikant von diesem ($p < 0,01$).

In Abb. 5 sind zum Vergleich die Kurven des AV und AVG mit gemeinsamen Nullpunkt gezeichnet. Es zeigt sich im AVG eine geringfügig verminderte Glykogen-Utilisation: während der Gesamtabbau im AV 30,0 % des Ruheglykogen-Spiegels beträgt, liegt er im AVG bei 28,7 %. Diese geringe Differenz ist wegen der besprochenen inter- und

intraindividuellen Schwankungen statistisch nicht zu sichern ($p > 0,05$). Als Konzentrationen ausgedrückt betragen die Differenzen der in Abb. 5 gezeichneten Relativwerte nach 10 min Arbeitszeit 0,02 g%, nach 30 min 0,55 g% und nach 120 min 0,26 g% (alle $p > 0,05$).

8.43 Glykogenvorrat und Trainingszustand

Wie bereits in Abschn. 8.41 erwähnt, streuen die Ruhewerte relativ stark entsprechend einem Variationskoeffizienten von 26 %. Ein Vergleich der jeweils für dieselbe Person in Tab. 6 bzw. 8 verzeichneten Ruhewerte zeigt, daß die intraindividuelle Abweichung dieser Paardifferenzen geringer als die interindividuelle Standardabweichung ist (Standardabweichung aus Doppelwerten: 0,96 g%, Variationskoeffizient 14,3 %, bezogen auf einen Mittelwert von 6,71 g%). Der Unterschied zwischen den beiden zugehörigen Varianzen (s^2) ist mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 % zu sichern. Das besagt, daß jedem Probanden ein im Vergleich zum Kollektiv relativ konstanter Glykogenvorrat zugeordnet werden kann. Um zu erfassen, inwieweit dieser Wert mit dem Trainingszustand der Vp korreliert, wurden Glykogen-Vorrat und in den Hauptversuchen erbrachte Ergometerleistung in ein Koordinatensystem eingetragen. Für den Glykogen-Spiegel wurde das arithmetische Mittel aus den Ruhewerten im AV und AVG gebildet. Die Ergometerleistung ist Tab. 5 entnommen.

Die eingestellte Ergometerleistung ist insofern ein Maß für den Trainingszustand, als sie der maximalen O_2 -Aufnahme (s. Abschn. 7.3) direkt proportional ist. Gut trainierte Vpn erbrachten aufgrund höherer maximaler O_2 -Aufnahme in den beiden Hauptversuchen höhere Leistungen als untrainierte.

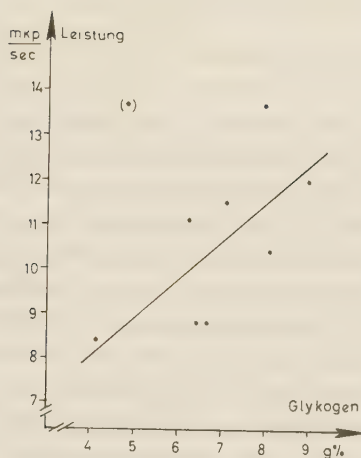


Abb. 6: Beziehung zwischen dem Glykogen-Vorrat des M. quadriceps femoris in Ruhe und dem Trainingszustand der Vp, ausgedrückt durch diejenige Leistung, die 50 % der maximalen O_2 -Aufnahme entspricht.

Wie Abb. 6 zeigt, korrelieren mit einer Ausnahme alle Ruheglykogen-Werte gut mit der eingestellten Leistung. Für die Regressionsgleichung

$$N = 0,87 c + 4,52 \quad [9]$$

mit N = Leistung (mkp/sec), c = Glykogen-Konzentration (g%), 0,87 = Regressionskoeffizient (mkp/sec · g%), 4,52 = Y-Achsenabschnitt (mkp/sec) ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,69$, der für $n = 8$ die lineare Beziehung zwischen den beiden Größen mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 % sichert. Der der

Vp 7 entsprechende Wert (s. Abb. 6 in Klammern) wird nach dem Test von DIXON (29) mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % als Ausreißer ausgewiesen und deshalb nicht in die Berechnung einbezogen (s. Abschn. 11.2).

8.44 Beziehungen des Glykogens zu anderen Stoffwechselparametern

Wie in Abschn. 7 erwähnt, wurden an den 9 Vpn der vorliegenden Serie außer Glykogen und Pulsfrequenz eine Reihe weiterer Parameter gemessen. Ziel der Untersuchung war es u.a., die Beziehungen der Glykogen-Utilisation zum Glucose- und Fett-Stoffwechsel zu untersuchen. Da sich die Glykogen-Abbauraten im AVG gegenüber dem AV nicht signifikant änderten, während die Spiegel der Blutglucose, des Insulins und der freien Fettsäuren sowie der RQ unter dem Einfluß der oral zugeführten Glucose starke, statistisch gesicherte Veränderungen erfuhren (62), konnten nur Beziehungen der letztgenannten Parameter untereinander, nicht jedoch mit dem Glykogen aufgezeigt werden. Die Erhöhung des Blutglucose-Spiegels durch orale Glucosegabe führte nach KRETSCHMER (62) zu einer Mehrverbrennung von Kohlenhydraten, beurteilt nach dem RQ, doch wurden durch diese Stoffwechselumstellung im wesentlichen Fette eingespart. Die Glykogen-Utilisation blieb, wie die vorliegende Arbeit zeigt, weitgehend unbeeinflusst.

C. DISKUSSION

9. Muskelbiopsie

9.1 Biopsienadel

Die in Abschn. 5.2 beschriebene Muskelsaugbiopsienadel ist für Serienentnahmen von Muskelproben zur Glykogenbestimmung geeignet. Die angegebenen Maße (s. Abschn. 5.4) wurden zum Teil durch theoretische Überlegungen, zum Teil durch das vorhandene Material bestimmt. Für die Herstellung eines Prototyps stand nur eine geringe Auswahl nichtrostender Stahlrohre zur Verfügung, so daß Durchmesser und Wandstärken der beiden Hohlzylinder nicht frei gewählt werden konnten. Die Stabilität des für die Einstichkanüle verwendeten Rohrs bestimmte darüberhinaus wesentlich die Größe der seitlichen Aussparung von ca. 10 mm^2 . Durch die vorgegebenen Rohrdurchmesser und die Fläche dieser Öffnung wird das in Abschn. 5.4 angegebene Probengewicht stark festgelegt. Größere Ausbeuten sind durch Verwendung eines Innenzylinders mit weiterem Lumen oder durch Anbringung größerer und/oder mehrerer Aussparungen möglich.

Eine Absteckung des gesamten Verwendungsbereichs der hier beschriebenen Biopsienadel ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Zahlreiche Anwendungsgebiete über den Rahmen der Muskelentnahme zur quantitativen Glykogen-Bestimmung hinaus sind denkbar. Die Analyse anderer Metaboliten als Glykogen aus entnommenem Muskelmaterial ist bei Verwendung geeigneter Mikromethoden möglich. Für die quantitative Bestimmung labiler Substanzen wie ATP oder CP dürfte die kurze Entnahmedauer einen Vorteil gegenüber bisher üblichen Verfahren bedeuten. Die Kanüle kann nach der Probenentnahme in flüssigen Stickstoff getaucht werden, so daß die Muskelprobe sofort tiefgefroren ist.

Für Enzymaktivitätsbestimmungen stehen jetzt Mikromethoden zur Verfügung, die bei entsprechender Wahl der Flüs-

sigkeitsvolumina und Verwendung eines genügend miniaturisierten Homogenisators auf Muskelproben von ca. 6 mg Gewicht übertragbar sind. Eine Methode zur Bestimmung der Hexokinase-Aktivität im menschlichen Skelettmuskel wird z.Zt. praktisch erprobt. Die Größe der mit der Muskelsaugbiopsienadel erhaltenen Gewebeproben genügt auch für diese Analyse.

Inwieweit die Proben für klinische Untersuchungen, besonders für die Licht- und Elektronenmikroskopie geeignet sind, wird ebenfalls z.Zt. in Zusammenarbeit mit einigen Kliniken inner- und außerhalb Münchens untersucht. Die große Zahl von Anfragen gerade aus dem klinischen Bereich beweist die Bedeutung, die eine einfache und zuverlässige Biopsietechnik für die medizinische Diagnostik besitzt.

9.2 Biopsietechnik

Ein einfaches und wenig eingreifendes Biopsie-Verfahren ist Voraussetzung für die Durchführung serienmäßiger Untersuchungen über den Muskel-Stoffwechsel des gesunden Menschen. Während beim Kranken im Rahmen größerer klinischer Maßnahmen die Entnahme von Muskelgewebe vergleichsweise wenig ins Gewicht fällt, können der gesunden Vp schmerzhaft Eingriffe oder unangenehme Nachwirkungen nicht ohne weiteres zugemutet werden. Von den 18 Probanden, die an den Untersuchungen teilnahmen (s. Abschn. 7.1) waren 8, von den 9 Vpn, die in die vorliegende Auswertung eingingen, 3 Leistungssportler. Gerade bei aktiven Sportlern ist die Erhaltung der vollen Leistungsfähigkeit Grundvoraussetzung für die Teilnahme an einer derartigen Versuchsserie. Nach eigenen Erfahrungen erfüllt die Technik von BERGSTRÖM (8) diese Forderung nicht in vollem Maße. Vor allem wurden über Schmerzen während der Entnahme geklagt. Die verschiedenen Techniken, die von den einzelnen Untersuchern aus praktischen Erwägungen heraus angewendet werden, unter-

scheiden sich nicht in Bezug auf die Schmerzhaftigkeit. Sie zielen alle darauf ab, die Sicherheit dafür zu erhöhen, daß Muskelgewebe in den Zylinder gelangt. Neben dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Fingerdruck wird auch die im Muskel befindliche Nadel gegen das Gewebe gedrückt oder der Schneidezylinder mehrfach auf- und abbewegt, evtl. unter gleichzeitigem Drehen der Nadel. Wird das Muskelgewebe durch Unterdruck in die Kanüle gesaugt, so entfallen diese schmerzhaften Manipulationen bei gleichzeitiger Erhöhung der Sicherheit dafür, daß sich tatsächlich eine Probe in der Nadel befindet; denn die Saugkraft wirkt ausschließlich und in vollem Umfang an der seitlichen Öffnung.

Die geklagten, unangenehmen Nachwirkungen des Eingriffs mit der Nadel nach Bergström sind vornehmlich auf den relativ großen Hautschnitt zurückzuführen. Obwohl einige Untersucher auf eine chirurgische Wundversorgung verzichten, erscheint diese vom medizinischen Standpunkt aus angebracht. Für die Versorgung der Stichinzision ist jedoch statt der störenden Klammern oder Fäden ein Druckverband aus Tupfer und Heftpflaster ausreichend. Auch die Gefahr von Blutungen, größerer Faszienverletzungen oder der Durchtrennung von Hautnerven wird durch eine kleinere Inzision vermindert.

3 Vpn, an denen zu Vergleichszwecken beide Nadeln erprobt wurden, bestätigen, daß bei der hier beschriebenen Biopsienadel Entnahmeschmerz und Nachwirkungen vermindert waren.

10. Glykogen-Bestimmung

Das hier beschriebene Verfahren erlaubt die serienmäßige Analyse des Glykogen-Gehalts in Muskelproben sehr geringen Gewichts. Die besondere Problematik des Muskelfeuchtge-

wichts als Bezugsgröße ist bei EMANS (31) ausführlich dargestellt. Der Feuchtigkeitsgehalt der Muskelproben wird von Autor zu Autor durch die Art der Präparation geändert. Diese reicht von starkem Anpressen der Probe bis zu lockerem Wälzen auf einer Plastikunterlage, wird aber häufig überhaupt nicht näher beschrieben. EMANS (31) legte die Proben auf Filterpapier und führte die notwendigen Manipulationen zur Entfernung von Fett und Bindegewebe in einer feuchten Kammer durch. Durch Wahl des Trockengewichts als Bezugsgröße werden besser standardisierte Bedingungen und größere Reproduzierbarkeit erzielt und darüberhinaus eine rationelle Analysendurchführung erreicht, da die gefriergetrockneten Proben aufbewahrt werden können.

Die vorliegende Methode ist speziell für die Arbeit mit dem Mikrolitersystem "Eppendorf" entwickelt worden. Da dieses System heute in zahlreichen biochemischen Laboratorien Verwendung findet, kann das Verfahren von anderen Untersuchern ohne Änderung übernommen werden. Die aufeinander abgestimmten Teile des Systems vereinfachen den Analysengang wesentlich.

Die chemische und die enzymatische Glykogenhydrolyse sind in etwa gleichwertig: Nach PASSONNEAU et al. (81) und BERGMAYER (7) ist die Ausbeute der enzymatischen Methode höher als die der chemischen. Wie in Abschn. 6.51 ausführlich besprochen, trifft dies für die hier angegebenen Bedingungen nicht zu. Das eingesetzte Glykogen wurde bei Hydrolyse von 1 h vollständig wiedererhalten. Die geringere Ausbeute bei Hydrolyse von 2 h kann durch Reversion und Bildung von 5-Hydroxyfurfural und Lävulinsäure (13) erklärt werden. Die Reproduzierbarkeit der chemischen Analyse ist bei Verwendung der vorliegenden Methode etwa genau so gut wie bei dem Verfahren von KEPPLER und DECKER (57), für das Variationskoeffizient von 2,5 % angegeben wird (ohne Angabe des Meßbereichs).

Die Spezifität der chemischen Methode dürfte für die Glykogen-Bestimmung ausreichen, da unter den angegebenen Fällungsbedingungen nur Glykogen (36) und kein "Nicht-Glykogen-Komplex" (18) erhalten wird. Die von HULTMAN (46) angegebenen Störungen durch reduzierende Substanzen werden durch die enzymatische Glucose-Bestimmung vermieden.

Ein Vorteil der enzymatischen Hydrolyse ist die kurze Inkubationszeit von ca. 15 min bei geeigneter Wahl der Bedingungen, vor allem bei genügend hoher Konzentration an Amyloglucosidase bzw. Glykogenphosphorylase. Dem stehen geringerer Kostenaufwand und einfachere Handhabung der Reagenzien bei der Säurehydrolyse gegenüber.

Die Verringerung des Fehlers durch die in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Verbesserungen gegenüber dem von HULTMAN (46) angegebenen methodischen Fehler ($s/\sqrt{2} = 0,07 \text{ g}/100 \text{ g Feuchtwicht}$) ist nach dem F-Test hoch signifikant ($p < 0,01$).

11. Arbeitsversuche

11.1 Arbeitsschwere

Ziel der Vorversuche war es, mit einem möglichst einfachen Verfahren für die Hauptversuche eine Leistung zu ermitteln, die vom Trainingszustand möglichst unabhängig bei allen Vpn ein ähnliches Stoffwechselverhalten auslösen und die im Bereich der Dauerleistungsgrenze liegen sollte. Von der Pulsdauerleistungsgrenze (PDLG) (77), an der eine Arbeit über mehrere Stunden ohne Erhöhung der Pulsfrequenz und Erholungspulssumme durchgeführt werden kann, ist die O_2 -Dauerleistungsgrenze (43) zu unterscheiden, die durch eine gerade noch nicht von der Arbeitsdauer abhängige "Sauerstoffschuld" gekennzeichnet ist. Die Er-

mittlung beider Grenzen erfordert mehrere Versuche. Das stattdessen in der vorliegenden Serie verwendete Verfahren wurde von HOLLMANN (43) angegeben. Zwar ist nach neueren Untersuchungen (108, 109) das "steady-state" nicht bei jeder Arbeitsschwere schon nach 3 min erreicht, wie es von HOLLMANN (43) vorausgesetzt wurde, doch ist das Verfahren geeignet, in einem einzigen Versuchsgang mit guter Näherung diejenige Leistung zu ermitteln, bei der eine Pulsfrequenz von etwa 130 min^{-1} über längere Zeit aufrechterhalten werden kann (Ausdauergrenze). Die objektiven und subjektiven Zeichen der Ermüdung nehmen bei dieser Belastung über Stunden nur langsam zu.

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden diese Forderungen voll erfüllt. Die Pulsfrequenz bewegte sich bei allen Vpn um einen Wert von 130 min^{-1} und stieg im Verlauf des Versuchs leicht bis mittelgradig an. Kein Proband war am Versuchsende erschöpft.

Trainingsbedingte Unterschiede im Stoffwechselverhalten der Vpn wurden nicht beobachtet, was darauf hindeutete, daß die geforderte Arbeit dem individuellen Trainingszustand gut angepaßt war. Die drei Sportstudenten der vorliegenden Serie (Vp 5, 7 und 9) hatten als einzige eine maximale O_2 -Aufnahme von über 3 l/min und erbrachte entsprechend in den Hauptversuchen die höchsten Leistungen (vgl. Tab. 5).

11.2 Ruheglykogen-Spiegel

Entsprechend der unterschiedlichen, im Vorversuch ermittelten Leistungsfähigkeit besaßen die Vpn jeweils zu Arbeitsbeginn unterschiedliche Glykogenreserven, und zwar so, daß mit besserem Trainingszustand auch der Ruheglykogen-Spiegel erhöht war (s. Abb. 6). Unter den Sportstudenten wiesen zwei (Nr. 5 und 9) die höchsten Ruheglykogen-Werte auf und lagen mit 9,74 und 9,25 g% jeweils vor

Beginn des AV als einzige über 9 g%. Eine Ausnahme bildet die Vp 7, die als Leistungssportler sowohl im AV als auch im AVG mit 5,44 bzw. 4,20 g% einen auffallend niedrigen Ausgangsspiegel aufwies. Da die Vp 7 vermutlich dasselbe Trainingspensum wie die Probanden 5 und 9 absolvierte (alle drei studierten Sport an derselben Hochschule im selben Semester) und vor den beiden Versuchen keine außergewöhnlichen sportlichen Leistungen vollbracht hatte, kann eine Erklärung hier nicht gegeben werden. Informationen über ernährungsbedingte und konstitutionelle Unterschiede zwischen den drei Sportstudenten oder über die Trainingsschwerpunkte liegen nicht vor.

Die beobachtete Beziehung zwischen Trainingszustand und Ruheglykogen-Gehalt des Muskels steht im Einklang mit den Befunden zahlreicher Autoren. Beim Meerschweinchen wurden nach Lauftraining erhöhte Glykogen-Werte gefunden, denen eine vermehrte Hexokinase- und Glykogensynthetase-Aktivität im Skelettmuskel entsprach (63). Auch beim Menschen bewirkt Training eine Erhöhung des Glykogen-Vorrats, wie HULTMAN (48) zeigte. In einer neueren Untersuchung konnten MORGAN et al. (76) erstmals diesen trainingsbedingten Anstieg auch beim Menschen in Beziehung zu einer Steigerung der Hexokinase- und Synthetase-Aktivität setzen. Die größeren Glykogen-Vorräte des trainierten Muskels sind sportphysiologisch bedeutend; denn ein erhöhter Glykogen-Spiegel befähigt zu verlängerter schwerer Muskelarbeit (2, 95). Eine hohe Kontraktionsfrequenz des Muskels kann bei erhöhtem Glykogen-Spiegel länger aufrechterhalten werden (51).

11.3 Glykogen-Abbau bei mittelschwerer Arbeit

Der Glykogenabbau bei erschöpfender Fahrradergometer-Arbeit war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Der zeitliche Verlauf wurde von BERGSTRÖM und HULTMAN (10) untersucht. Sie fanden eine semilogarithmische Abnahme

der Glykogen-Konzentration im M. vastus lateralis. In einer späteren Arbeit (46) wird ein dreiphasiger Verlauf beschrieben: Während der ersten 15 bis 20 Arbeitsminuten findet der stärkste Abbau statt, gefolgt von einer Periode geringerer und weitgehend konstanter Glykogen-Verbrennung. In der dritten Phase liegt der Glykogen-Spiegel im Bereich extrem niedriger Werte und sinkt bis zum erschöpfungsbedingten Arbeitsabbruch nur langsam ab. Bei erschöpfender Laufband-Arbeit finden COSTILL et al. (25) im M. soleus und im M. gastrocnemius des Menschen einen geringeren Abbau als bei gleichschwerer Fahrradergometer-Arbeit.

Über das Verhalten des Glykogens bei leichterer Arbeit ist relativ wenig bekannt. BERGSTRÖM und HULTMAN (10) finden bei geringerer Arbeitsschwere einen verminderten Glykogen-Abbau. EHRENSTEIN et al. (30) untersuchten die Glykogen-Konzentration im M. vastus lateralis bei Fahrradergometer-Arbeit unterhalb der PDLG. Nach 4 h waren ca. 28 %, nach 8 h ca. 32 % des Glykogen-Vorrats verbrannt. Untersuchungen, die detailliertere Aussagen über den zeitlichen Verlauf des Abbaus unter Dauerleistungsbedingungen gestatten, liegen nicht vor.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, daß sich das Verhalten des Glykogen-Spiegels bei Arbeit im Dauerleistungsbereich von dem unter Höchstleistungsbedingungen deutlich unterscheidet. Zwar findet auch hier ein meßbarer Glykogen-Abbau statt, doch wird die maximale Abbaurate nicht zu Arbeitsbeginn beobachtet. Über mindestens 30 Arbeitsminuten sind keine signifikanten Veränderungen des Glykogen-Spiegels zu beobachten. KOTCHEN et al. (61) beobachteten während 10 min dauernder Ergometerarbeit bei 40 % der maximalen O_2 -Aufnahme keine Erhöhung des Adrenalin- und Noradrenalin-Spiegels. Daraus läßt sich zum Teil die fehlende Aktivierung des Glykogen-Abbaus erklären.

Die von BERGSTRÖM und HULTMAN (10) gefundene Beziehung zwischen Arbeitspuls und Glykogen-Abbau ließ sich aus den

vorliegenden Werten nicht bestätigen. Das negative Ergebnis wird darauf zurückgeführt, daß jede Vp mit etwa der gleichen relativen Arbeitsschwere belastet wurde und deshalb beide Variablen in einem zu engen Bereich streuten.

Nach Arbeit von 10 min resultiert im Mittel ein leichter Anstieg der Glykogen-Konzentration im Muskel, der in Einzelfällen beträchtliche Werte (bis zu 2,72 g%) erreicht. Da keine Daten über die enzymatischen Vorgänge im arbeitenden menschlichen Skelettmuskel verfügbar sind, kann nicht entschieden werden, ob diese Erhöhung des Glykogen-Spiegels auf einem methodischen Fehler beruht oder ob ihr ein tatsächlicher Glykogen-Aufbau bei einzelnen Vpn zugrundeliegt. Zwar lassen die in Tab. 7 genannten Zahlen den methodischen Fehler als Ursache möglich erscheinen, doch sind einzelne Differenzen zwischen Ruhe-Konzentration und dem Glykogen-Gehalt nach 10 bzw. 30 Arbeitsminuten groß genug, um auch einen Glykogen-Aufbau nicht voll auszuschließen.

DANFORTH et al. (28) beobachteten, daß eine elektrische Muskelreizung bei der Maus den Anteil der I-Synthetase an der Gesamtaktivität erhöht. PIRAS und STANELONI (86) fanden bei tetanischer Reizung einen starken Anstieg der Glucose-6-Phosphat-Konzentration im Muskel, der bei Simulation der Lebendverhältnisse in vitro zu einer Erhöhung der Synthetase-Aktivität trotz gleichbleibenden Verhältnisses I/D-Form führte. Ein Anstieg der Glucose-6-Phosphat-Konzentration wurde in neueren Untersuchungen (3, 11) auch im menschlichen Muskel bei schwerer Arbeit gefunden. Obwohl die beweisenden Untersuchungen am Menschen bei mittelschwerer Arbeit noch ausstehen, ist dies ein Hinweis dafür, daß möglicherweise der Glykogen-Abbau während Arbeit kein unidirektionaler Vorgang ist, sondern aus der Differenz zwischen Synthese und Verbrennung resultiert.

Eine Nettosynthese käme unter dieser Voraussetzung einem relativen Überwiegen der Synthetase- über die Phosphorylase-Aktivität gleich.

11.4 Einfluß einer oralen Glucosegabe auf den Glykogen-Abbau

Die im AVG gegebene Glucose wurde resorbiert, verbrannt und nicht im Urin ausgeschieden. Dies geht aus der Erhöhung des respiratorischen Quotienten sowie dem negativen Ausfall des Harnglucosetests hervor (62). Dennoch war nur eine geringfügige, statistisch nicht zu sichernde Differenz zwischen dem Glykogen-Abbau im AV und AVG zu beobachten, was mit der Beobachtung von PAUL und ISSEKUTZ (82) im Einklang steht, daß Plasmaglucose nur einen geringen Einfluß auf die Energiegewinnung des arbeitenden Muskels hat. Die Beteiligung der Blutglucose an der Gesamtverbrennung wird bei mittelschwerer Arbeit auf weniger als 16 % geschätzt (37). Bei leichter Arbeit wird sogar trotz des Fehlens von Glucose-6-Phosphatase im Muskel (59) Glucose freigesetzt, was auf die Produktion des nicht phosphorylierten Zuckers durch Amyloglucosidase (104) oder durch unspezifische Phosphatasen (45) zurückgeführt wird. Eine Messung des lokalen RQ zeigt, daß selbst bei arbeitsbedingter Glucose-Mehraufnahme keine Mehrverbrennung stattfindet (4).

BERGSTRÖM und HULTMAN (10) gelang es, eine kleine Differenz zwischen dem Glykogen-Abbau in einem Arbeitsversuch mit und einem Versuch ohne Glucose-Infusion zu sichern (keine Angabe des Signifikanzniveaus!): Er ließ die Vp zuerst mit einem Bein auf dem Fahrradergometer fahren und belastete anschließend das andere Bein bei gleichzeitiger Glucose-Infusion. Beide Male wurde der Glykogen-Abbau gemessen. So konnten die Versuchsbedingungen in besonderem Maße konstant gehalten werden. In der vorliegenden Arbeit war diese Versuchsanordnung wegen der zusätzlichen Fragestellungen (62) nicht möglich. Da aber BERGSTRÖM und HULTMAN (10) nur eine geringe Differenz fanden und AHLBORG et al. (2) keinen Effekt einer Glucose-Infusion

auf die Glykogen-Utilisation beobachteten, wird aus dem Ergebnis dieser Arbeit geschlossen, daß die Wirkung einer oralen Glucosegabe auf den Glykogen-Abbau während muskulärer Arbeit im Dauerleistungsbereich ebenso wie die einer Glucose-Infusion nur gering ist und keine besondere physiologische Bedeutung besitzt. Der starke Einfluß einer Glucosegabe auf den Fettstoffwechsel während körperlicher Arbeit wird von KRETSCHMER (62) diskutiert.

Trotz der weitgehenden Übereinstimmung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Befunden anderer Untersucher können wichtige Fragen über den Einfluß von Glucose auf den Glykogen-Stoffwechsel noch nicht beantwortet werden. Der menschliche M. vastus lateralis ist ein gemischter Muskel mit etwa 45 % slow-twitch- und entsprechend 55 % fast-twitch-Fasern (35). Da die verschiedenen Fasertypen unterschiedliches Verhalten in Bezug auf den Glykogen- und Glucose-Stoffwechsel zeigen (15), können die bisherigen Arbeiten, die ausschließlich den M. vastus lateralis berücksichtigen, nicht als repräsentativ für den gesamten Muskelstoffwechsel gelten. Auch über den Glykogen-Stoffwechsel bei sehr geringen Ergometerbelastungen (10 bis 30 % der maximalen O_2 -Aufnahme) und bei isometrischer Arbeit liegen noch keine Ergebnisse vor. Aufschlußreichste Ergebnisse sind vor allem aus den Untersuchungen über die am Glykogen- und Glucose-Stoffwechsel des Menschen beteiligten Muskelenzyme zu erwarten, deren Erforschung erst im Beginn steht.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine Muskelbiopsienadel, die das Saugprinzip der Leberbiopsienadel von MENGHINI mit dem Schneideprinzip der Muskelbiopsienadel von BERGSTRÖM kombiniert, wird beschrieben. Diese Nadel gestattet es, mehrfach Muskelproben aus dem menschlichen Skelettmuskel zu entnehmen. Der Eingriff ist im Vergleich zu dem bisher bekannten Verfahren kürzer und weniger schmerzhaft. Eine chirurgische Wundversorgung ist unnötig. Das mittlere Gewicht der entnommenen Proben beträgt $6,71 \pm 2,67$ mg.
2. Eine Mikromethode zur Glykogen-Bestimmung in Proben des menschlichen M. vastus lateralis wird angegeben. Durch Verwendung von Natriumsulfat als Kopräzipitat wird der Vorgang der Glykogen-Extraktion gegenüber gebräuchlichen Verfahren erheblich verkürzt. Durch geeignete Wahl der Hydrolyse-Bedingungen wird das extrahierte Glykogen innerhalb von 60 min vollständig zu Glucose gespalten. Diese wird mit der spezifischen Hexokinase-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode enzymatisch bestimmt. Gefriertrocknung der Muskelprobe und Bezug des Glykogen-Gehalts auf das Muskel-trockengewicht erhöhen die Reproduzierbarkeit der Methode signifikant gegenüber dem von HULTMAN angegebenen Verfahren.
3. 9 gesunde männliche Vpn im Alter von 19 bis 27 Jahren führen auf dem Fahrradergometer bei einer Leistung, die 50 % der maximalen O_2 -Aufnahme entsprach. Vor und nach der Belastung sowie nach 10 und 30 min Arbeitszeit wurden Biopsien zur Glykogen-Bestimmung entnommen. 2 Wochen später wurde in einem zweiten, gleichartigen Versuch zusätzlich eine kontinuierliche orale Glucose-Gabe verabreicht.

Nach 10 bzw. 30 min Arbeitszeit war der Glykogen-Spiegel nicht signifikant verändert. Nach 120 min war der Glykogen-

gehalt signifikant abgesunken, im ersten Versuch um 30,0 %, im zweiten um 28,7 %. Dieser Unterschied war statistisch nicht zu sichern. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen:

- a) Der Glykogen-Abbau bei mittelschwerer Arbeit unterscheidet sich deutlich von dem bei schwerer Arbeit, bei der die Konzentration zu Arbeitsbeginn am stärksten absinkt.
- b) Eine hohe orale Glucose-Gabe hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Glykogen-Verbrennung.
Die positive Korrelation zwischen Ruheglykogen-Gehalt des Muskels und dem Trainingszustand wurde bestätigt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AHLBORG, B., BERGSTRÖM, J., BROHULT, J., EKELOUND, L., HULTMAN, E. and MASCHIO, G.: Human muscle glycogen content and capacity for prolonged exercise after different diets. *Särtryck ur Försvarsmedicin* 3, 85 (1967).
2. AHLBORG, B., BERGSTRÖM, J., EKELOUND, L. and HULTMAN, E.: Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta physiol. scand.* 70, 129 (1969).
3. AHLBORG, B., BERGSTRÖM, J., EKELOUND, L., GUARNIERI, G., HARRIS, R., HULTMAN, E. and NORDESJÖ, L.: Muscle metabolism during isometric exercise performed at constant force. *J. appl. physiol.* 33, 224 (1972).
4. BAKER, P. and MOTTRAM, R.: The metabolism of exercising human muscle. *J. appl. physiol.* 194, 64P (1968).
5. BARNARD, R. and PETER, J.: Effect of training and exhaustion on hexokinase activity of skeletal muscle. *J. appl. physiol.* 27, 691 (1969).
6. BELOCOPITOV, E., FERNANDEZ, M., BIRNBAUMER, L. and TORRES, H.: Factors affecting muscle glycogen synthetase activity. *J. biol. chem.* 242, 1227 (1967).
7. BERGMAYER, H.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim (1970).
8. BERGSTRÖM, J.: Muscle electrolytes in man. *Scand. J. clin. lab. invest.*, 14, Suppl. 68 (1962).
9. BERGSTRÖM, J., HERMANSEN, L., HULTMAN, E. and SALTIN, B.: Diet, muscle glycogen and physical performance. 70, 175 (1967).
10. BERGSTRÖM, J., HULTMAN, E.: A Study of the glycogen metabolism during exercise in man. *Scand. J. clin. lab. invest.* 19, 218 (1967).
11. BERGSTRÖM, J., GUARNIERI, G. and HULTMAN, E.: Carbohydrate metabolism and electrolyte changes in human muscle tissue during heavy work. *J. appl. physiol.* 30, 122 (1971).
12. BERNARD, O.: Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses. Paris (1857).
13. BEYER, H.: Lehrbuch der organischen Chemie. Hirzel, Leipzig (1968).
14. BLOOM, W., LEWIS, G., SCHUMPERT, M. and TSUNG-MEN SHEN: Glycogen fraction of liver and muscle. *J. biol. chem.* 188, 631 (1950).

15. BOCEK, R., BASINGER, G. and BEATTY, C.: Comparison of glucose uptake and carbohydrate utilization in red and white muscle. *Am. J. physiol.* 210, 1108 (1966).
16. BRAND, T.: A rapid working micro-modification of Pflüger's glycogen method. *Scand.Arch.Physiol.* 75, 195 (1937).
17. BURCHARD, W., KEPPLER, D. und DECKER, K.: Über Größe, Form und Partikelgewicht von nativem Glykogen aus Rattenleber. *Makromol.Chem.* 115, 250 (1968).
18. CARROLL, N., LONGLEY, R. and ROE, J.: The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. biol. chem.* 220, 583 (1956).
19. CHAPLER, C. and STAINSBY, W.: Carbohydrate metabolism in contracting dog skeletal muscle in situ. *Am. J. physiol.* 215, 995 (1968).
20. CORI, G., CORI, C. and SCHMIDT, G.: The role of glucose-1-phosphate in the formation of blood sugar and synthesis of glycogen in the liver. *J. biol. chem.* 129, 629 (1939).
21. CORI, G. and LARNER, J.: Action of amylo-1,6-glucosidase and phosphorylase on glycogen and amylopectin. *J. biol. chem.* 188, 17 (1951).
22. CORI, G. and ILLINGWORTH, B.: The effect of epinephrine and other glycogenolytic agents on the phosphorylase a content of muscle. *Biochem. biophys. acta* 21, 105 (1956).
23. CORNBATH, M., RANDLE, P. PARMEGGIANI, A. and MORGAN, H.: Regulation of glycogenolysis in muscle. *J. biol. chem.* 238, 1592 (1963).
24. CORSI, A., MIDRIO, M. and GRANATA, A.: In situ utilization of glycogen and blood glucose by skeletal muscle during tetanus. *Am. J. physiol.* 216, 1534 (1969).
25. COSTILL, D. SPARKS, K. GREGOR, R. and TURNER, C.: Muscle glycogen utilization during exhausting running. *J. appl. physiol.* 31, 353 (1971).
26. DANFORTH, W., HELMREICH, E. and CORI, C.: The effect of contraction and of epinephrine on the phosphorylase activity of frog sartorius muscle. *Proc.nat.acad.sci.* 48, 1191 (1962).
27. DANFORTH, W. and HELMREICH, E.: The conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in frog sartorius muscle. *J. biol. chem.* 239, 3133 (1964).
28. DANFORTH, W.: Glycogen synthetase activity in skeletal muscle. Interconversion of two forms and control of glycogen synthesis. *J. biol. chem.* 240, 588 (1965).

29. DIXON, W.: Analysis of extreme values. Ann. Math. Statist. 21, 488 (1950).
30. EHRENSTEIN, W., EMANS, C. und MÜLLER-LIMMROTH, W.: Der Glykogenabbau im arbeitenden Muskel während 8-stündiger Ergometerarbeit und seine Hemmung durch mäßige Blutzuckerspiegelerhöhung. Pflügers Arch. 320, 233 (1970).
31. EMANS, C.: Wirkung einer kontinuierlichen Glukose-Infusion auf den muskulären Glykogenabbau bei einer achtstündigen Arbeit an der Pulsdauerleistungsgrenze. Dissertation, Med.Fak. München (1971).
32. FRIEDMANN, L. and LARNER, D.: Studies on UDPG-Glucan-Transglucosylase. Biochem. 2, 669 (1963).
33. GOLD, A. JOHNSON, R. and TSENG, J.: Kinetic mechanism of rabbit muscle glycogen phosphorylase a. J. biol. chem. 245, 2564 (1970).
34. GOLDEMBERG, S.: Reactions of glycogen synthesis and of glycolysis. in D-Glucose und verwandte Verbindungen. Stuttgart (1966).
35. GOLLNICK, P., ARMSTRONG, R. SAUBERT, C., PIEHL, K. and SALTIN, B.: Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. J. appl. physiol. 33, 312 (1972).
36. HANDEL VAN, E.: Estimation of glycogen in small amounts of tissue. Anal. Biochem. 11, 256 (1965).
37. HAVEL, R. PERNOW, B. and JONES, L.: Uptake and release of free fatty acids and other metabolites in the legs of exercising men. J. appl. physiol. 23, 90 (1967).
38. HEDMAN, R.: The available glycogen in man and the connection between rate of oxygen intake and carbohydrate usage. Acta physiol. scand. 40, 305 (1957).
39. HELMREICH, E. and CORI, C.: The effects of pH and temperature on the kinetics of the phosphorylase reaction. Proc. nat. acad. sci 52, 647 (1964).
40. HELMREICH, E. and CORI, A.: Regulation of glycolysis in muscle. Advanc.Enzym.Regulat. 3, 91 (1965).
41. HELMREICH, E. MICHAELIDES, M. and CORI, C.: Effects of substrates and a substrate analog on the binding of 5'-adenylic acid to muscle phosphorylase a. Biochem. 6, 3695 (1967).
42. HERMANSEN, L., PRUETT, E., OSNES, J. and GIERE, F.: Blood glucose and insulin in response to maximal exercise and glucose infusion. J. appl. physiol. 29, 13 (1970).

43. HOLLMANN, W.: Höchst- und Dauerleistungsfähigkeit des Sportlers. Barth, München (1963).
44. HOLZER, H.: Regulation of enzymes by enzyme catalyzed chemical modification. *Advanc. Enzymol.* 32, 297 (1969).
45. HUDLICKA, O.: Uptake of substrates in isolated contracting slow and fast muscles in situ in relation to fatigue. *Advanc. exp. med. biol.* 11, 215 (1971).
46. HULTMAN, E.: Studies on muscle metabolism of glycogen and active phosphate in man with special reference to exercise and diet. *Scand. J. lab. clin. invest.* 19, Suppl. 94 (1967).
47. HULTMAN, E.: Muscle glycogen in man determined in needle biopsy specimens. *Scand. J. clin. lab. invest.* 19, 209 (1967).
48. HULTMAN, E.: Physiological role of muscle glycogen in man with special reference to exercise. *Circulation Res.* 20, Suppl. 1 (1967).
49. HULTMAN, E. and BERGSTRÖM, J.: Muscle glycogen synthesis in relation to diet studied in normal subjects. *Acta med. scand.* 182, 109 (1967).
50. KARLSSON, J. and SALTIN, B.: Lactate, ATP and CP in working muscles during exhaustive exercise in man. *J. appl. physiol.* 29, 598 (1970).
51. KARLSSON, J. and SALTIN, B.: Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J. appl. phys.* 31, 203 (1971).
52. KARLSSON, J., NORDESJÖ, L., JORFELDT, L. and SALTIN, B.: Muscle lactate, ATP, and CP levels during exercise after physical training in man. *J. appl. physiol.* 33, 199 (1972).
53. KARPATKIN, S., HELMREICH, E. and CORI, C.: The effect of anaerobiosis, insulin, and stimulation on hexokinase activity of frog sartorius muscle. *Fed. Proc.* 24, 423 (1965).
54. KARPATKIN, S.: Interconvertible molecular forms of soluble hexokinase in frog skeletal muscle. *J. biol. chem.* 243, 3841 (1968).
55. KASTENSCHMIDT, L., KASTENSCHMIDT, J. and HELMREICH, E.: The effect of temperature on the allosteric transitions of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. *Biochem.* 7, 4543 (1968).
56. KEIDEL, W.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart (1967).
57. KEPPLER, D. und DECKER, B.: Glykogen-Bestimmung mit Amyloglucosidase. in *Methoden der enzymatischen Analyse*, 2, 1089, Weinheim (1970).

58. KEUL, J., DOLL, E., KEPPLER, D. und REINDELL, H.: Die Veränderungen arterieller Substratspiegel unter dem Einfluß körperlicher Arbeit. *Int.Z. angew. Physiol. Arbeitsphysiol.* 22, 356 (1966).
59. KEUL, J., DOLL, E. und KEPPLER, D.: Muskelstoffwechsel. Barth, München (1969).
60. KLAUS, E.: D-Glucose und verwandte Kohlenhydrate im Sport. in D-Glucose und verwandte Verbindungen, Stuttgart (1966).
61. KOTCHEN, T., HARTLEY, L., RICE, T., MOUGEY, E., JONES, L. and MASON, J.: Renin, norepinephrine and epinephrine responses to graded exercise. *J. appl. physiol.* 31, 178 (1971).
62. KRETSCHMER, M.:
Dissertation, Med. Fak. München (1973).
63. LAMB, D., PETER, J., JEFFRESS, R. and WALLACE, H.: Glycogen, hexokinase, and glycogen synthetase adaptations to exercise. *Am. J. physiol.* 217, 1628 (1969).
64. LAMB, D., PETER, J., JEFFRESS, R. and WALLACE, H.: Glycogen, hexokinase, and glycogen synthetase adaptations to exercise. *J. appl. physiol.* 27, 691 (1969).
65. DE LANGE, R., KEMP, R., RILEY, W. COOPER, R. and KREBS, E.: Activation of skeletal muscle phosphorylasekinase by adenosine triphosphate and adenosine 3',5'-monophosphate. *J. biol. chem.* 243, 2200 (1968).
66. LARNER, J.: The action of branching enzymes on outer chains of glycogen. *J. biol. chem.* 202, 491 (1953).
67. LELOIR, L. and CARDINI C.: Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *J. Am. chem. soc.* 79, 6340 (1957).
68. MANNERS, D.: Enzymic synthesis and degradation of starch and glycogen. *Advanc. Carbohydr. Chem.* 17, 371 (1962).
69. MATTENHEIMER, H.: Mikromethoden für das klinisch-chemische Laboratorium. Berlin (1966).
70. MAYER, S. and KREBS, E.: Studies on the phosphorylation and activation of skeletal muscle phosphorylase and phosphorylasekinase in vivo. *J. biol. chem.* 245, 3153 (1970).
71. MENGHINI, G.: Un effettivo progresso nella tecnica della puntura biopsia del fegato. *Rass. Fisiopat. chir. ter.* 29, 756 (1957).
72. METZGER, B. HELMREICH, E. and GLASER, L.: The mechanism of activation of skeletal muscle phosphorylase a by glycogen. *Proc. nat. acad. sci.* 57, 994 (1967).

73. MEYER, W., FISCHER, E. and KREBS, E.: Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{2+} . Biochem. 3, 1033 (1964).
74. MONOD, J., WYMAN, J. and CHANGEUX, J.: On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12, 88 (1965).
75. MORGAN, H., REGEN, D. and PARK, C.: Identification of a mobile carrier-mediated sugar transport system in muscle. J. biol. chem. 239, 369 (1964).
76. MORGAN, T., COBB, L., SHORT, F., ROSS, R. and GUNN, D.: Effects of long-term exercise on human muscle mitochondria. Advanc.exp.med.biol. 11, 87 (1971).
77. MÜLLER, E.: Ein Leistungs-Puls-Index als Maß der Leistungsfähigkeit. Arbeitsphysiol. 14, 271 (1950).
78. NASSE, O.: Chemie und Stoffwechsel der Muskeln. in Handbuch der Physiologie des Menschen, Leipzig (1879).
79. ORRELL, S., BUEDING, E. and REISSIG, M.: in Control of glyco-gen metabolism. London (1964).
80. OSTERBERG, A.: The estimation of glycogen in small amounts of tissue. J. biol. chem. 85, 97 (1929).
81. PASSONNEAU, J., GATFIELD, P., SCHULTZ, D. and LOWRY, O.: An enzymic method for measurement of glycogen. Anal. biochem. 19, 315 (1967).
82. PAUL, P. and ISSEKUTZ, B.: Role of extramuscular energy sources in the metabolism of the exercising dog. J. appl. physiol. 22, 615 (1967).
83. PETER, J., JEFFRESS, R. and LAMB, D.: Exercise: Effects on hexokinase activity in red and white skeletal muscle. Science 160, 200 (1968).
84. PETTE, D.: Energieliefernder Stoffwechsel des Muskels unter zellphysiologischem Aspekt. in Symp.progr. Muskeldystrophie, 492 (1966).
85. PFLÜGER, E.: Meine Methode der quantitativen Analyse des Glykogens und die Arteigentümlichkeiten der Substanzen des Thierleibes. Pflügers Arch. ges. Physiol. 129, 362 (1909).
86. PIRAS, R. and STANELONI, R.: In vivo regulation of rat muscle glycogen synthetase activity. Biochem. 8, 2153 (1969).
87. POPPER, H. und WOZASEK, O.: Kohlenhydratstudien an der Leichenleber bei Diabetes mellitus. Klin. Wschr. 12, 702 (1933).

88. PRUETT, E.: Plasma insulin levels during prolonged exercise. *Advanc. exp. med. biol.* 11, 165 (1971).
89. REICHARD, G., ISSEKUTZ, B., KIMBEL, P., PUTNAM, R., HOCELLA, N. and WEINHOUSE, S.: Blood glucose metabolism in man during muscular work. *J. appl. physiol.* 16, 1001 (1961).
90. ROE, J., RAILEY, J., SMITH, B. and GRAY, R.: Comparative studies of heart and liver glycogen in fasting and fed rats. *Fed. proc.* 19, 84 (1960).
91. ROE, J., RAILEY, J., GRAY, R. and ROBINSON, J.: Complete removal of glycogen from tissue by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J. biol. chem.* 236, 1244 (1961).
92. ROSELL-PEREZ, M., VILLAR-PALASI, C. and LARNER, J.: Studies on UDPG-glycogen-transglucosylase. *Biochem.* 1, 763 (1962).
93. RULON, R., SCHOTTELIUS, D. and SCHOTTELIUS, B.: Effect of stimulation on phosphorylase levels of excised anterior tibial muscles of the mouse. *Am. J. physiol.* 200, 1236 (1961).
94. SACHS, L.: *Statistische Auswertungsmethoden*. Berlin (1968).
95. SALTIN, B. and HERMANSEN, L.: Glycogen stores and prolonged severe exercise. in *Nutrition and physical activity*. Uppsala (1967).
96. SAHYUN, M.: Determination of glycogen in tissues. *J. biol. chem.* 93, 227 (1931).
97. SANSON, A.: Note sur la formation physiologique du sucre dans l'économie animale. *Compt. rend.* 44, 1323 (1857).
98. SCHMIDT, G. und BRUNNERT, H.: Quantitative Glykogenbestimmung mit Hilfe der Papierchromatographie. *J. chrom.* 10, 190 (1963).
99. SEITZ, D.: Die Bedeutung der Muskelbiopsie für die Diagnose und Therapie chronischer muskulärer Prozesse. *Dt. Z. Nervenheilk.* 187, 166 (1965).
100. STETTEN DE, W. and STETTEN, M.: Glycogen metabolism. *Physiol. Rev.* 40, 505 (1960).
101. SUTHERLAND, E. and RALL, T.: The properties of an adenineribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{++} , and epinephrine or glucagon. *Am. chem. soc.* 21, 623 (1965).
102. VENDSALU, A.: Plasma concentrations of adrenalin and nor-adrenalin during muscular work. *Acta physiol. scand.* 49, Suppl. 173 (1960).

103. VILLAR-PALASI, C. and LARNER, J.: Insulin treatment and increased UDPD-glycogen-transglucosylase activity in muscle. Arch. biochem. biophys. 94, 436 (1961).
104. WAHREN, J., AHLBORG, G. FELIG, P. and JORFELDT, L.: Glucose metabolism during exercise in man. Advanc. exp. med. biol. 11, 189 (1971).
105. WALKER, D.: Animal Hexokinase. in Essays in Biochemistry 2, 33, London-New York (1966).
106. WALSH, D., PERKINS, J. and KREBS, E.: An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. J. biol. chem. 243, 3763 (1968).
107. WANG, J., TU, J. and LO, F.: Effect of glucose-6-phosphate on the nucleotide site of glycogen phosphorylase b. J. biol. chem. 245, 3115 (1970).
108. WASSERMAN, K., KESSEL VAN, A. and BURTON, G.: Interaction of physiological mechanisms during exercise. J. appl. physiol. 22, 71 (1967).
109. WHIPP, B. and WASSERMAN, K.: Oxygen uptake kinetics for various intensities of constant work load. J. appl. physiol. 33, 351 (1972).
110. Wissenschaftliche Tabellen GEIGY. Geigy AG, Basel (1968).
111. WILSON, J., SACKTOR, B. and TIEKERT, C.: In situ regulation of glycolysis in tetanized cat skeletal muscle. Arch. biochem. biophys. 120, 542 (1967).
112. WOLLENBERGER, A. and KRAUSE, E.: Activation of glucan-phosphorylase and related metabolic changes in dog myocardium following arrest of blood flow. Biochem. biophys. acta 67, 337 (1963).

LEBENS LAUF

Am 19. Juni 1948 wurde ich als erstes Kind des Hochschul-
lehrers Dr. Georg Hoffmann und seiner Ehefrau Margit Hoff-
mann, geb. Micksch in Dentlein am Forst, Kreis Feuchtwangen,
geboren.

1953 Übersiedlung nach Freising

1954 - 1956 Besuch der Seminarschule der Lehrerbildungsan-
stalt Freising

1956 - 1958 Besuch der St.Georgs-Volksschule Freising

1958 - 1961 Besuch des Domgymnasiums Freising

1961 - 1967 Besuch des Camerlohergymnasiums Freising

1967 Abitur

Seit 1967 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München.

München, Februar 1973

D A N K S A G U N G

Herrn Prof.Dr.med. W. MÜLLER-LIMMROTH danke ich für die Themenstellung, für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Institut für Arbeitsphysiologie der Technischen Universität München sowie für sein förderndes Interesse und die stets hilfreiche Unterstützung.

Herrn Prof.Dr.med. H. SCHWIEGK danke ich für die Übernahme des Coreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. MÜLLER-WENING, der durch seinen Rat und seine tätige Hilfe das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit ermöglichte und als Versuchsleiter die Durchführung der Experimente überwachte.

Herrn Dr. W. EHRENSTEIN danke ich für seine beratende Unterstützung bei der Versuchsplanung und -durchführung.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zusammen mit den Untersuchungen von Herrn cand.med. M. KRETSCHMER durchgeführt. Ihm und der medizinisch-technischen Assistentin Fräulein S. SCHLONSKI möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die ausgezeichnete Zusammenarbeit danken.

